



Eder Shamir Borges Lopes Semedo

Licenciado em Ciências Biológicas e da Saúde

**Utilização de sementes de *Jatropha curcas* L.
provenientes de Cabo Verde para a produção de
biodiesel**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Energia e Bioenergia

Orientadora: Doutora Ana Cristina Oliveira Justino, Investigadora Auxiliar,
LNEG

Coorientador: Prof. Doutor Nuno Lapa, Professor Auxiliar, FCT-UNL

Jurí:

Presidente: Prof. Doutora Benilde Simões Mendes
Arguente: Prof. Doutora Margarida Boavida Pontes Gonçalves
Vogal: Doutora Ana Cristina Ramos Oliveira Justino
Vogal: Prof. Doutor Nuno Carlos Lapa dos Santos Nunes



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2011

Título: Utilização de sementes de *Jatropha curcas* L. provenientes de Cabo Verde para a produção de biodiesel

Autor: Eder Shamir Borges Lopes Semedo

Contacto do autor: edersemedo@gmail.com

*O conteúdo da presente dissertação é da inteira responsabilidade do autor.
Não é autorizada a cópia, total ou parcial, do conteúdo da presente dissertação.
É autorizada a citação do conteúdo da presente dissertação, desde que acompanhada da
respetiva referência bibliográfica, de acordo com as normas internacionais de citação de
trabalhos científicos.*

Copyright

“A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor”.

Agradecimentos

Gostaria de, antes de mais, agradecer a quem possibilitou e contribuiu para a realização deste trabalho, etapa final de mais um período de aprendizagem.

À minha orientadora, Doutora Ana Cristina Oliveira, pela possibilidade de realização do estágio na Unidade de Bioenergia do LNEG e pelo fundamental auxílio em todos os aspetos deste trabalho.

Ao meu coorientador, Professor Doutor Nuno Lapa, pelos prestimosos conselhos, colaboração na parte do trabalho efetuado nas instalações da FCT-UNL e fundamentais aulas durante o Mestrado em Energia e Bioenergia.

À Professora Doutora Benilde Mendes, coordenadora do Mestrado em Energia e Bioenergia, que, antes de mais, possibilitou a minha frequência neste mestrado.

Aos professores do Mestrado em Energia e Bioenergia, por tudo o que me transmitiram durante o período letivo e que, sem dúvida, foram importantes para que pudesse chegar a esta fase mais e melhor preparado.

A todos os que pude conhecer, e com os quais pude conviver ou trabalhar, na Unidade de Bioenergia do LNEG, tanto pela força anímica como pelo auxílio em muitos dos passos dados no laboratório. Aos colegas de gabinete, bolseiros, estagiários, investigadores e técnicas de laboratório, fica o meu sincero obrigado.

Aos colegas do Mestrado em Energia e Bioenergia, companheiros nos últimos 3 anos e, particularmente, àqueles cuja ligação se prolongou para além das fronteiras da faculdade, cuja amizade foi importantíssima em diversos períodos.

Aos amigos, mais próximos ou mais distantes, geograficamente, mas todos próximos em pensamento, que bastante significam para mim, que foram sempre revitalizadores de ânimo nos piores momentos e parceiros de gargalhadas nos melhores, que aturam tudo e mais alguma coisa.

Aos meus pais e ao meu irmão, simplesmente por tudo, por todo o apoio, por toda a confiança.

A todos os que, efémera ou prolongadamente, fizeram parte do meu percurso, académico ou pessoal, e dos quais sempre pude retirar o mais pequeno ensinamento, a mais insignificante resposta, que me fizeram questionar a mim mesmo e aos outros, e que, na cadeia de acontecimentos indissociáveis que é a vida, são elos, maiores ou menores, sem os quais nada seria igual, pelo menos nesta dimensão.

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu irmão, companheiro de longa data, cuja presença constante, mesmo na ausência, foi a força motriz para que seguisse em frente.

Resumo

Este trabalho teve como objetivo a produção de biodiesel a partir do óleo de sementes de *Jatropha curcas* provenientes de Cabo Verde.

Foram utilizadas sementes de duas ilhas, Santiago e Fogo, tendo os óleos extraídos revelado alguma variabilidade nos valores dos parâmetros em que foram caracterizados, nomeadamente na composição em ácidos gordos e no índice de acidez. Para os óleos provenientes das sementes do Fogo obtiveram-se valores para o índice de acidez superiores a 5 mg KOH/g. Atendendo a este valor, a transesterificação básica do óleo do Fogo, após degomagem, foi precedida de diferentes processos (neutralização, catálise ácida) destinados à redução dos ácidos gordos livres. O teor de ésteres metílicos obtido, em todos os casos, foi superior ao especificado para um biodiesel de boa qualidade (> 96,5% (m/m)).

O óleo de Santiago foi sujeito a um processo de transesterificação enzimática, tendo-se utilizado como catalisador a lipase Lipozyme TL IM. A otimização deste processo foi realizada mediante a metodologia estatística das superfícies de resposta, com um desenho composto central com 4 variáveis. A percentagem de água, a razão molar metanol:óleo e a temperatura foram os parâmetros que mostraram ter mais influência na formação dos ésteres. As condições definidas e validadas como ótimas, que conduziram ao valor mais elevado de ésteres metílicos (97,4% (m/m)), corresponderam a 27,5°C de temperatura, 6:1 de razão molar, 0,726% (m/m) de lipase pura e 18% (m/m) de água. Estes resultados mostram que a transesterificação do óleo de *Jatropha curcas*, na presença da lipase Lipozyme TL IM, é auspiciosa, atendendo às baixas temperatura e quantidade de lipase requeridas para a obtenção de um elevado teor de ésteres. Após purificação, o biocombustível obtido encontrava-se dentro das especificações da norma EN 14214, relativamente aos parâmetros analisados.

Verificou-se ser possível, também, a reutilização da enzima Lipozyme TL IM, tendo-se observado uma perda de rendimento pouco significativa ao longo dos 5 ensaios realizados.

Palavras-chave: óleo, biodiesel, *Jatropha curcas*, transesterificação enzimática

Abstract

The aim of this work was the production of biodiesel from *Jatropha curcas* seed oils imported from Cape Verde.

Seed oils from two islands, Santiago and Fogo, were used. The characterization of the oils showed some variability in the parameters considered, especially for the fatty acid profile and the acid value. The acid value for Fogo island seed oils was above 5 mg KOH/g, and that meant that in order to do the alkaline transesterification procedure, a pretreatment of the oil, besides degumming, was necessary, by neutralization and acid catalysis, that would reduce the free fatty acids content. The methyl esters content, after both pretreatment procedures, was higher than the value specified for a high quality biodiesel (> 96.5% (w/w)).

Santiago island seed oil was transesterified using an enzymatic catalyst – commercial lipase Lipozyme TL IM. The process was optimized by using the response surface statistical methodology, with a central composite design with 4 variables. The percentage of water, the methanol:oil molar ratio and the temperature were the variables found to have the highest influence in the methyl ester content. The optimal reaction conditions, which resulted in 97.4% (w/w) of methyl ester content were found at a temperature of 27.5°C, 6:1 of molar ratio, 0.726% (w/w) of lipase and 18% (w/w) of water. These results show that the transesterification of *Jatropha curcas* seed oil, by using Lipozyme TL IM, is a promising procedure, especially when taking into account the low temperature and added lipase required in order to obtain a high methyl ester content. After purification, the biofuel complied EN 14214 standard specifications for the analyzed parameters.

It was observed that it was possible to reuse the lipase Lipozyme TL IM without a significant drop in the methyl ester conversion after 5 assays.

Keywords: oil, biodiesel, *Jatropha curcas*, enzymatic transesterification

Índice Geral

Agradecimentos.....	III
Dedicatória.....	V
Resumo.....	VII
Abstract.....	IX
Índice de Figuras.....	XV
Índice de Quadros.....	XVII
Lista de abreviaturas e siglas.....	XIX
1. Introdução.....	1
1.1. Biocombustíveis.....	2
1.1.1. Óleos vegetais.....	2
1.1.2. Dos óleos vegetais ao biodiesel – História.....	3
1.1.3. Panorama mundial do biodiesel.....	5
1.2. <i>Jatropha curcas</i> L.....	7
1.2.1. Descrição geral.....	7
1.2.2. Variabilidade genética.....	10
1.2.3. Usos da <i>Jatropha curcas</i>	11
1.2.4. A <i>Jatropha curcas</i> em Cabo Verde.....	12
1.2.5. Vantagens e desvantagens da <i>Jatropha curcas</i>	13
1.2.6. Potencial do óleo de <i>Jatropha curcas</i> para produção de biodiesel.....	14
1.3. Métodos de produção de biodiesel.....	15
1.3.1. Transesterificação com catalisadores químicos homogêneos.....	17
1.3.1.1. Transesterificação alcalina.....	17
1.3.1.2. Transesterificação ácida.....	18
1.3.2. Transesterificação com catalisadores químicos heterogêneos.....	18
1.3.3. Transesterificação enzimática.....	19
1.3.4. Transesterificação com recurso a ultrassons.....	19
1.3.5. Transesterificação com recurso a micro-ondas.....	20
1.3.6. Transesterificação em condições supercríticas.....	20
1.4. Lipases.....	21
2. Materiais e Métodos.....	25
2.1. Matérias-primas.....	26
2.2. Reagentes.....	27
2.3. Equipamentos.....	28
2.4. Métodos de caracterização das sementes.....	29
2.4.1. Teor de água e matérias voláteis.....	29
2.4.2. Teor de óleo.....	30
2.4.2.1. Extração em Soxhlet.....	30

2.4.2.2. Extração mecânica.....	31
2.5. Métodos de pré-tratamento do óleo.....	32
2.5.1. Degomagem.....	33
2.5.2. Neutralização.....	33
2.6. Métodos físico-químicos de caracterização do óleo e do biodiesel.....	34
2.6.1. Índice de acidez.....	34
2.6.2. Índice de saponificação.....	36
2.6.2.1. Peso molecular.....	37
2.6.3. Índice de iodo.....	37
2.6.4. Teor de fósforo.....	39
2.6.5. Estabilidade à oxidação.....	41
2.6.6. Teor de água.....	42
2.6.7. Ponto de inflamação.....	42
2.7. Métodos cromatográficos de caracterização do óleo e do biodiesel.....	43
2.7.1. Composição do óleo em termos de ácidos gordos.....	43
2.7.2. Teor de ésteres metílicos totais e de éster metílico do ácido linolénico.....	45
2.7.3. Teores de glicerol livre e total, e de mono, di e triglicéridos no biodiesel.....	46
2.7.4. Teor de metanol.....	48
2.8. Métodos de caracterização das preparações enzimáticas.....	50
2.8.1. Doseamento da proteína imobilizada.....	51
2.8.2. Doseamento da proteína solúvel.....	52
2.9. Método de imobilização da enzima solúvel.....	53
2.10. Métodos de produção de biodiesel a partir do óleo de <i>Jatropha curcas</i>	54
2.10.1. Transesterificação via catálise básica.....	54
2.10.2. Transesterificação enzimática.....	55
2.10.2.1. Otimização do processo de transesterificação enzimática do óleo de <i>Jatropha curcas</i>	56
3. Resultados e Discussão.....	59
3.1. Caracterização das sementes de <i>Jatropha curcas</i>	60
3.1.1. Caracterização do lote obtido em abril de 2010 (primeiro lote).....	60
3.1.2. Caracterização do lote obtido em agosto de 2010 (segundo lote).....	63
3.1.2.1. Índice de acidez – influência de métodos de pré-tratamento.....	66
3.1.2.2. Teor de fósforo.....	67
3.1.2.3. Estabilidade à oxidação.....	68
3.2. Transesterificação alcalina do óleo de <i>Jatropha curcas</i>	69
3.2.1. Catálise básica precedida de neutralização.....	69
3.2.2. Catálise básica precedida de catálise ácida.....	69
3.2.3. Catálise básica sem pré-tratamento do óleo.....	70
3.3. Transesterificação enzimática do óleo de <i>Jatropha curcas</i>	71

3.3.1. Otimização das condições reacionais - Desenho Composto Central a 4 variáveis.....	71
3.3.2. Condições ótimas – determinação e validação.....	81
3.3.3. Efeito do tempo de reação.....	84
3.3.4. Reutilização da lipase.....	85
3.3.5. Utilização de outros óleos de <i>Jatropha curcas</i>	86
3.3.6. Utilização de outras lipases comerciais.....	87
3.3.6.1. Imobilização da lipase solúvel.....	89
3.4. Caracterização do biocombustível.....	90
3.4.1. Teor de mono, di e triglicéridos, glicerol livre e total.....	90
3.4.2. Ponto de inflamação, teor de água e metanol.....	91
4. Conclusões.....	93
5. Referências bibliográficas.....	97
Anexos.....	103
Anexo I - Cromatograma da determinação da composição em ácidos gordos do óleo das sementes de Santiago (lote de abril).....	104
Anexo II - Resultados da estabilidade à oxidação do óleo degomado das sementes de Santiago (lote de agosto).....	105
Anexo III - Resultados da determinação do teor de mono, di e triglicéridos, glicerol livre e glicerol total.....	106
Anexo IV - Estimativa dos efeitos determinados pelo “Statistica 8”.....	107

Índice de Figuras

Figura 1.1. Éster de um ácido carboxílico.....	2
Figura 1.2. Exemplo de uma molécula de triglicérido (http://www.indiana.edu/~oso/Fat/Definitions.html).....	2
Figura 1.3. Exemplo da transesterificação de um triglicérido por um álcool.....	4
Figura 1.4. Produção de biocombustíveis a nível mundial nos anos 2000 e 2010, em milhões de toneladas de petróleo-equivalente (British Petroleum, 2011).....	5
Figura 1.5. <i>Jatropha curcas</i> numa encosta rochosa da Cidade Velha, ilha de Santiago (Correia, 2009).....	6
Figura 1.6. Distribuição da <i>Jatropha curcas</i> a nível mundial: a verde, regiões onde esta espécie pode ser encontrada (http://www.jatropha.wur.nl/).....	7
Figura 1.7. Espécies compreendidas no género <i>Jatropha</i> , distribuídas pela maior aproximação entre as mesmas (Heller, 1996).....	8
Figura 1.8. Árvore e semente de <i>Jatropha curcas</i> (www.tradeleads.at).....	9
Figura 1.9. Cariograma da <i>Jatropha curcas</i> , com 22 cromossomas (Carvalho <i>et al.</i> , 2008).....	10
Figura 1.10. Sequência de reações que ocorrem aquando da transesterificação (Demirbas, 2005).....	15
Figura 1.11. Representação de um triglicérido, com realce para as 3 cadeias de ácidos gordos representadas por R1, R2 e R3, em função da sua posição (www.sophim-sheabutter.com).....	21
Figura 2.1. Sementes de <i>Jatropha curcas</i> com a cápsula protetora.....	26
Figura 2.2. Sementes de <i>Jatropha curcas</i> com casca.....	26
Figura 2.3. Amêndoa das sementes de <i>Jatropha curcas</i>	27
Figura 2.4. Montagem para a extração soxhlet: extratores com os cartuchos que contêm as sementes moídas ligados a balões de destilação e condensadores; por baixo, a manta de aquecimento.....	30
Figura 2.5. Prensa mecânica utilizada na extração dos óleos, com representação da tremonha onde se introduzem as sementes (1), do recipiente onde se acumula o óleo extraído (2) e do recipiente onde se acumula o bagaço (3)	32
Figura 3.1. (A) óleo de sementes de Santiago extraído com parafuso com seletor de pressão com boca de tubulação de 10 mm (S10), após 1ª decantação; (B) óleo/lamas S10 submetido a 2ª decantação.....	64
Figura 3.2. Influência da molaridade da solução de neutralização na redução do índice de acidez do óleo.....	67
Figura 3.3. Reta de calibração da solução de albumina de soro bovino.....	73
Figura 3.4. Efeito da percentagem de água e da razão molar metanol:óleo no teor de ésteres metílicos, para uma temperatura de 35°C e 96,8 g de lipase pura.....	78
Figura 3.5. Efeito da percentagem de água e da temperatura no teor de ésteres metílicos, para uma razão molar metanol:óleo de 9:1 e 96,8 g de lipase pura.....	79

Figura 3.6. Efeito da temperatura e da razão molar metanol:óleo no teor de ésteres metílicos, para 96,8 g de lipase e 12% de água.....	79
Figura 3.7. Efeito da percentagem de água e da quantidade de lipase pura no teor de ésteres metílicos, para razão molar metanol:óleo de 9:1 e 35°C de temperatura.....	80
Figura 3.8. Efeito da quantidade de lipase pura e da razão molar metanol:óleo, para 35°C de temperatura e 12% de água.....	80
Figura 3.9. Efeito da quantidade de lipase pura e da temperatura no teor de ésteres metílicos, para valores de razão molar metanol:óleo de 9:1 e 12% de água.....	81
Figura 3.10. Variação do teor de ésteres metílicos ao longo do tempo, para 27,5°C de temperatura, 72,6 g de lipase pura, razão molar metanol:óleo de 6:1 e 18% de água.....	84
Figura 3.11. Estrutura cilíndrica porosa utilizada nos ensaios com a enzima imobilizada.....	85
Figura 3.12. Capacidade de reutilização da lipase imobilizada (Lipozyme TL IM) na reação de transesterificação, a 27,5°C de temperatura, razão molar metanol:óleo de 6:1, 72,6 g de lipase e 18% (m/m) de água.....	86

Índice de Quadros

Quadro 1.1. Nomenclatura de ácidos gordos com diferentes números de carbono e ligações duplas.....	3
Quadro 1.2. Perfil lipídico de diferentes óleos vegetais (Akbar <i>et al.</i> , 2009).....	14
Quadro 1.3. Comparação das vias metílica e etílica para produção de biodiesel (Parente, 2003).....	16
Quadro 2.1. Fatores de multiplicação dos ésteres metílicos de ácidos gordos para determinação do índice do iodo (EN 14214:2008).....	39
Quadro 2.2. Picos referenciados nos cromatogramas e respectivos tempos de retenção.....	44
Quadro 2.3. Parâmetros estudados na otimização do processo de produção de biodiesel e valores definidos no intervalo.....	56
Quadro 2.4. Ensaios sequenciais para níveis -1/+1, -2/+2 e pontos médios, com os valores definidos para os parâmetros em estudo.....	57
Quadro 3.1. Percentagem de casca nas sementes do Fogo.....	60
Quadro 3.2. Teor de óleo e teor de água e matérias voláteis para as diferentes variedades de <i>Jatropha curcas</i>	60
Quadro 3.3. Caracterização dos óleos extraídos das diferentes variedades de semente.....	61
Quadro 3.4. Composição em ácidos gordos das duas variedades de <i>Jatropha curcas</i>	62
Quadro 3.5. Percentagem de óleo extraído das duas variedades de sementes de <i>Jatropha curcas</i> por prensa mecânica, utilizando seletores de pressão com bocas de tubulação de diferente diâmetro (10 e 14 mm).....	63
Quadro 3.6. Caracterização dos óleos de <i>Jatropha curcas</i> obtidos por prensagem mecânica.....	64
Quadro 3.7. Composição em ácidos gordos dos óleos extraídos em agosto.....	65
Quadro 3.8. Composição em ácidos gordos de amostras de sementes de Santiago (Correia, 2009).....	66
Quadro 3.9. Índices de acidez para o óleo F14 bruto, degomado e neutralizado com soluções de NaOH de diferentes molaridades.....	67
Quadro 3.10. Teor de fósforo para o óleo “Fogo 14” bruto, após degomagem e após neutralização.....	68
Quadro 3.11. Estabilidade oxidativa para o óleo das sementes “S10”, antes e pós degomagem.....	68
Quadro 3.12. Condições da catálise básica e teor de ésteres metílicos obtido.....	69
Quadro 3.13. Condições da catálise ácida e teor de ésteres metílicos obtido.....	70
Quadro 3.14. Condições da catálise básica e teor de ésteres metílicos, após catálise ácida...70	
Quadro 3.15. Condições da catálise básica e teor de ésteres metílicos obtido.....	71
Quadro 3.16. Percentagem de ésteres metílicos obtidos com o óleo de purgueira para os ensaios definidos no desenho composto central.....	72
Quadro 3.17. Teor proteico da enzima Lipozyme TL IM.....	73

Quadro 3.18. Quantidade de lipase definida para os diferentes ensaios com a Lipozyme TL IM.....	73
Quadro 3.19. Correspondência do metanol, em gramas, para as razões molares metanol:óleo definidas nos ensaios do desenho composto central a 4 variáveis.....	74
Quadro 3.20. Valores teóricos do teor de ésteres metílicos, calculados a partir da equação polinomial para os ensaios do desenho composto central, em comparação com os valores reais.....	75
Quadro 3.21. Estimativas dos efeitos dos parâmetros e interações entre os mesmos no teor de ésteres metílicos e correspondente valor de p, determinado pelo Statistica 8.....	76
Quadro 3.22. Condições reacionais ótimas, conforme definidas pelo “Mathematica 5”, sob as quais foi efetuado o ensaio para obtenção do teor máximo de ésteres metílicos.....	82
Quadro 3.23. Diferentes condições reacionais para a produção de ésteres de ácidos gordos tendo como matéria-prima óleo de <i>Jatropha curcas</i> (Nazir <i>et al.</i> , 2009; Kumari <i>et al.</i> , 2009; Juan <i>et al.</i> , 2011).....	84
Quadro 3.24. Teor de ésteres metílicos obtido, nas condições ótimas, para os óleos S14 e F14.....	87
Quadro 3.25. Teor proteico determinado para a Novozym 435 e Lipozyme 100L.....	87
Quadro 3.26. Teor de ésteres obtido com as lipases comerciais Novozym 435 e Lipozyme 100L: 27,5°C, razão molar metanol:óleo de 6:1, 72,6 g de lipase pura, 18% de água e 18 horas de reação.....	88
Quadro 3.27. Teor proteico determinado para a Lipozyme 100L adsorvida no suporte de poliamida, quantidade de enzima utilizada na transesterificação e teor de ésteres obtido.....	89
Quadro 3.28. Percentagem de mono, di e triglicéridos, glicerol livre e glicerol total para amostras de biodiesel.....	90
Quadro 3.29. Caracterização do biocombustível de <i>Jatropha curcas</i> para os parâmetros ponto de inflamação, teor de água e teor de metanol.....	91

Lista de abreviaturas e siglas

AGL – ácidos gordos livres

AOAC – “Association of Analytical Communities”

BSA – albumina de soro bovino

BSP – partículas de suporte da biomassa

DA – degomagem com água

DE – degomagem especial

EC – classe da enzima

EN – norma europeia

FAO – Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

GTZ – Companhia Alemã para a Cooperação Internacional

IA – índice de acidez

II – índice de iodo

IS – índice de saponificação

JC – *Jatropha curcas*

LNEG – Laboratório Nacional de Energia e Geologia

PM – peso molecular

n.d. – não detetado/ não determinado

1. Introdução

1.1. Biocombustíveis

1.1.1. Óleos vegetais

Dá-se o nome de óleos vegetais aos óleos extraídos de plantas, principalmente a partir das sementes das mesmas. São maioritariamente compostos por triglicéridos, podendo também estar presentes ácidos gordos livres (longas cadeias carbonadas que estão desligadas da estrutura de glicerol), monoglicéridos ou diglicéridos.

Os triglicéridos são ésteres de glicerol (1,2,3-propanetriol) e ácidos gordos, sendo os ésteres os compostos derivados da reação de um álcool com um ácido carboxílico (figura 1.1.).

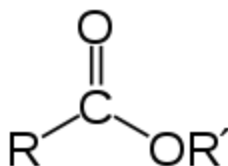


Figura 1.1. Éster de um ácido carboxílico.

Os triglicéridos possuem uma estrutura de 3 carbonos ligada a longas cadeias hidrocarbonadas (figura 1.2.). Estas cadeias estão ligadas através de um átomo de oxigénio e um grupo carbonilo, que corresponde a um átomo de carbono com uma ligação dupla a um segundo átomo de oxigénio. As diferenças entre óleos de diferentes proveniências derivam do tamanho das cadeias hidrocarbonadas e do seu grau de insaturação. Embora o número de carbonos desta cadeia possa variar, o mais comum é que o valor oscile entre os 14 e os 22 (Misra *et al.*, 2010)

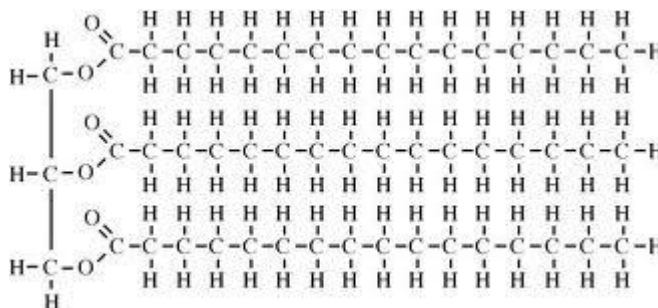


Figura 1.2. Exemplo de uma molécula de triglicérido (<http://www.indiana.edu/~oso/Fat/Definitions.html>).

O número de ligações duplas nas cadeias hidrocarbonadas varia entre 0 e 3, sendo que estas são, como foi referido, importantes nas propriedades do óleo. Os ácidos gordos sem ligações duplas dizem-se saturados e os que apresentam ligações duplas são chamados insaturados – monoinsaturados se só apresentam uma ligação dupla, polinsaturados se o número de ligações duplas for igual ou superior a 2. A presença de ligações duplas provoca a deformação da molécula, o que inibe a formação de cristais e diminui o ponto de fusão do óleo. Ácidos

saturados, por seu turno, tendem a ter elevados pontos de fusão e ser sólidos à temperatura ambiente, o que os torna candidatos pouco apetecíveis para a produção de biodiesel. Por outro lado, a presença de ligações duplas aumenta a probabilidade de oxidação por intermédio do oxigénio atmosférico (Misra *et al.*, 2010). A nomenclatura de alguns dos ácidos gordos que formam a cadeia carbonada do triglicérido é apresentada no quadro 1.1.

Quadro 1.1. Nomenclatura de ácidos gordos com diferentes números de carbono e ligações duplas.

Nome	Número de carbonos: Número de ligações duplas
Ácido láurico	12:0
Ácido mirístico	14:0
Ácido miristoleico	14:1
Ácido palmítico	16:0
Ácido palmitoleico	16:1
Ácido esteárico	18:0
Ácido oleico	18:1
Ácido linoleico	18:2
Ácido linolénico	18:3
Ácido eicosanóico	20:0
Ácido beénico	22:0

Os óleos com predominância de monoinsaturados serão assim os melhores candidatos para a produção de biocombustíveis, por apresentarem ponto de fusão inferior aos que contêm elevado teor de saturados e por terem menor propensão à oxidação quando comparados com os óleos polinsaturados.

Diferentes óleos vegetais apresentam diferentes composições em ácidos gordos, havendo também variação dentro da mesma espécie, fruto de condições de cultivo, condições climáticas ou variabilidade genética.

1.1.2. Dos óleos vegetais ao biodiesel - História

A possibilidade de utilização de óleos vegetais como biocombustível foi assunto que regressou à ordem do dia com a crise energética de 1970. Porém, o interesse do ser humano pelos óleos vegetais é muito mais antigo (Misra *et al.*, 2010).

Rudolf Diesel, inventor do motor que tem o mesmo nome e figura marcante do final do século XIX e início do século XX, revela num seu livro que, durante a Exposição Mundial de Paris em 1900, um pequeno motor diesel da companhia francesa Otto funcionou a óleo de amendoim, sendo que a informação foi divulgada a um número reduzido de pessoas. O motor tinha sido concebido para funcionar a gasóleo (diesel), mas não houve qualquer modificação *a priori* para os testes com óleo de amendoim (Knothe, 2005).

A ideia para o uso do óleo de amendoim terá partido do governo francês, mas Diesel terá ficado entusiasmado com a ideia. As razões por trás da ousadia terão sido as grandes reservas de amendoim das possessões francesas em África: a exploração de um recurso endógeno poderia eliminar a necessidade de importação de carvão ou petróleo por parte das colónias, podendo as mesmas tornar-se autossuficientes. Os resultados de então mostraram uma eficácia do óleo de origem vegetal no motor semelhante ao combustível de origem fóssil que substituíra. Outras potências coloniais também demonstraram interesse pelos óleos vegetais nessa época (primeiro quartel do século XX) (Knothe, 2005).

Os óleos vegetais foram também usados como combustível de recurso durante a 2ª Grande Guerra. A diminuição das trocas comerciais, uma das consequências deste conflito que envolveu inúmeros países, fez com que vários países olhassem para recursos endógenos que pudessem substituir o óleo mineral: o Brasil proibiu a exportação de algodão para que o óleo pudesse ser utilizado em caso de rotura do *stock* de óleo mineral, a Argentina, a China ou a Índia desenvolveram pesquisas sobre diversas fontes de óleos vegetais (Knothe, 2005).

Ainda durante a 2ª Grande Guerra, um couraçado japonês, Yumato, terá usado como combustível óleo de soja refinado (Knothe, 2005).

Após a 2ª Grande Guerra, a preocupação em relação à subida do preço do petróleo resultou num projeto na Ohio State University, onde o óleo de algodão e o de milho foram estudados, assim como misturas desses óleos com o óleo mineral.

A elevada viscosidade dos óleos foi o principal problema associado à utilização dos mesmos e, desde 1970, 4 soluções para reduzir a viscosidade foram encontradas: transesterificação, pirólise, diluição no óleo mineral e microemulsificação. A transesterificação (figura 1.3.) é o método mais comum e leva à obtenção de mono-álquil ésteres de óleos vegetais ou animais – o **biodiesel** (Knothe, 2005). A transesterificação de glicéridos não era, apesar disso, uma descoberta recente, tendo sido realizada por E. Duffy e J. Patrick em 1853 (Demirbas, 2005). O metanol tem sido o álcool mais usado para a reação de transesterificação por ser o mais barato na maioria dos países – sendo o Brasil uma notável exceção devido à sua elevada produção de etanol.

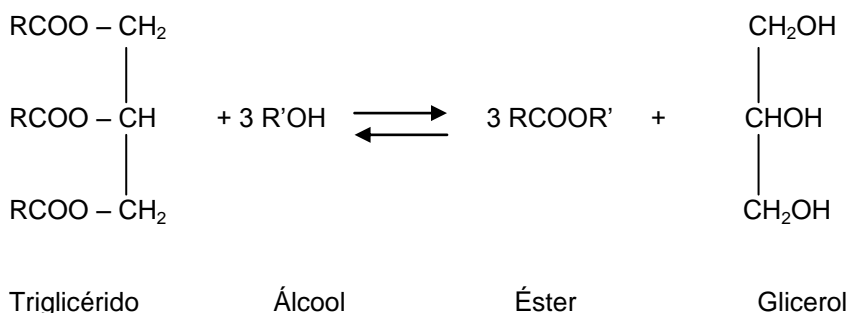


Figura 1.3. Exemplo da transesterificação de um triglicérido por um álcool.

A primeira patente para o biodiesel é belga, datando de 1937, de G. Chavanne – tratou-se do uso de ésteres etílicos de óleo de palma, obtidos através de catálise ácida, tendo-se

constatado que a viscosidade dos ésteres era bastante inferior à dos óleos que lhes deram origem.

A palavra “biodiesel” parece ter sido empregue, pela primeira vez, num artigo chinês, em 1988 (Knothe, 2005).

1.1.3. Panorama mundial do biodiesel

A Europa e a Ásia continuam a ser os principais impulsionadores da produção de biodiesel a nível mundial, ao passo que na América do Norte e na América do Sul a primazia, a nível de biocombustíveis, continua a ser do bioetanol (figura 1.4.), apesar da subida da quantidade de biodiesel produzido nos últimos 10 anos.

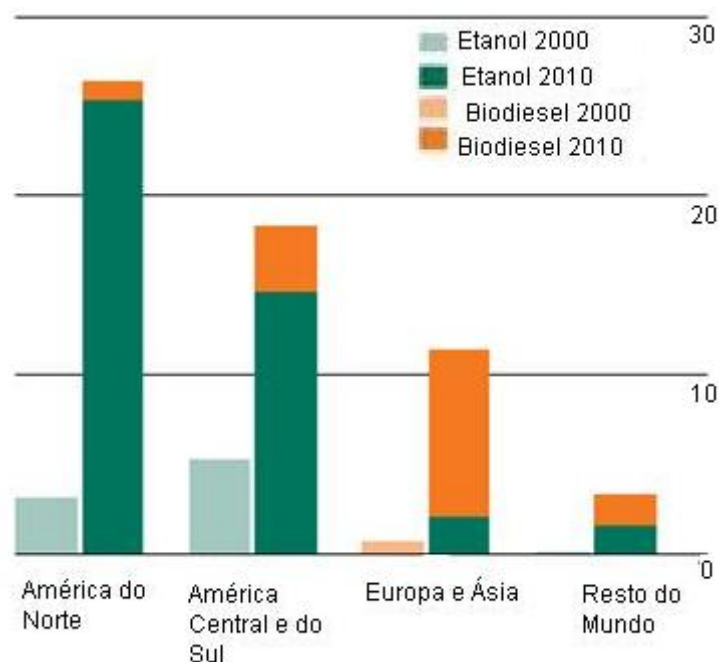


Figura 1.4. Produção de biocombustíveis a nível mundial nos anos 2000 e 2010, em milhões de toneladas de petróleo-equivalente (British Petroleum, 2011).

Em 2006, a produção de biodiesel na União Europeia representou 75% da produção mundial. Isso deve-se a um substancial apoio governamental à produção, estabelecimento de teores mínimos em biodiesel a ser adicionado aos combustíveis fósseis nos transportes e/ou menor carga fiscal. Nos Estados Unidos, o investimento em biocombustíveis ronda os 5,5 mil milhões de dólares anuais, cabendo ao biodiesel também uma fatia do investimento, com resultados no aumento da produção de 25 milhões de galões, em 2004, para 450 milhões de galões, em 2007. É previsto que, até 2020, a produção de países como a Malásia, a Índia, Brasil, China e Indonésia possam representar até 20% da produção mundial, sobretudo devido à aposta em culturas não alimentares, onde se inclui a *Jatropha curcas* ou as algas (Lam *et al.*, 2010).

No caso cabo-verdiano, a dependência energética em relação ao exterior é elevada, razão pela qual é fundamental procurar soluções internas que possam aliviar a deficitária balança económica do país.

O gasóleo (49%), a biomassa (lenha) (19%) e a gasolina (16%) eram as principais fontes de energia em 2008 (MECC, 2008). O custo da energia é 70% superior à média da União Europeia, o que é explicado pela insularidade e deficiências no setor energético nacional. O aumento do preço do barril de crude é, portanto, uma ameaça que paira constantemente sobre a economia.

Recentemente, a aposta na energia eólica tem vindo a aumentar, estando prevista a construção de 4 parques eólicos. A energia solar e a geotermia são outras vertentes em que se pretende apostar. O objetivo é que, até 2020, a energia de fontes renováveis represente pelo menos 50% da energia consumida no país (MECC, 2008).

No que concerne aos biocombustíveis, a *Jatropha curcas*, conhecida em Cabo Verde como purgueira, é a única opção viável no arquipélago (figura 1.5.), onde subsiste há séculos, podendo ser aproveitada para extração do óleo e fornecer dividendos ao país. A pouca exigência em água e nutrientes coaduna-se com o solo semiárido, não existindo o problema de ocupação de solos aráveis que se adequariam a culturas alimentares. Pode ser fonte de rendimento para pequenos agricultores, servindo o óleo para exportação ou uso local. Neste trabalho serão utilizadas sementes de *Jatropha curcas*, das ilhas de Santiago e do Fogo, para a produção de biodiesel.



Figura 1.5. *Jatropha curcas* numa encosta rochosa da Cidade Velha, ilha de Santiago (Correia, 2009).

1.2. *Jatropha curcas* L.

1.2.1. Descrição Geral

A informação precisa sobre a origem da *Jatropha* ter-se-á perdido no frenesim das trocas, de toda a ordem, entre os chamados “Velho” e “Novo Mundo”. Porém, aumenta o consenso entre os estudiosos sobre uma origem mexicana/centro-americana da planta, que hoje disfruta do estatuto de pantropical, podendo ser encontrada desde o Brasil às ilhas Fiji (figura 1.6.) (Achten *et al.*, 2010; Parawira, 2010).

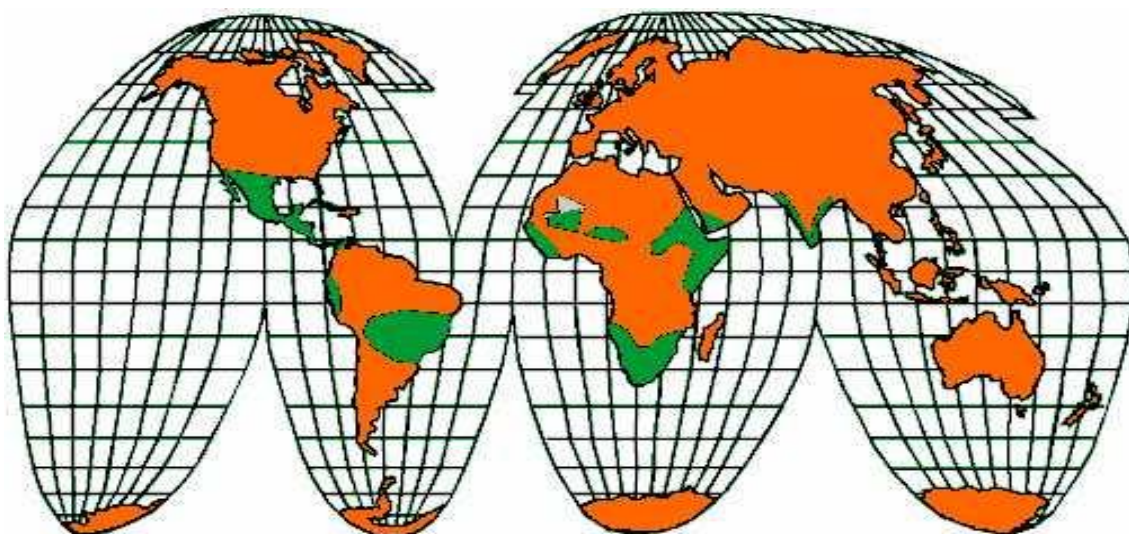


Figura 1.6. Distribuição da *Jatropha curcas* a nível mundial: a verde, regiões onde esta espécie pode ser encontrada (<http://www.jatropha.wur.nl/>).

O nome genérico vem do grego “iatrós” (médico) e “trophé” (comida), uma alusão ao uso da planta para fins medicinais (Heller, 1996). Aliás, terá sido o conhecimento das propriedades medicinais da planta a razão pela qual a planta terá sido trazida por marinheiros portugueses, a partir do século XVI, para as diferentes possessões em África e na Ásia (Achten *et al.*, 2010), a partir do Brasil. Terá sido a migração de nativos americanos da América Central para a América do Sul a causa para a presença da planta no Brasil, onde os marinheiros a encontraram (Correia, 2009).

O nome da espécie foi cunhado por Lineu em 1753, estando na origem do epíteto específico “curcas” o nome comum dado à planta em Malabar, na Índia (Heller, 1996). Conta-se em pelo menos 200 o número de nomes por que é conhecida a planta (Parawira, 2010)

O género *Jatropha* pertence à família das euforbiáceas, incluindo cerca de 170 espécies. Em regra, considera-se que a *Jatropha curcas* L. é a espécie mais primitiva, tendo ocorrido diferentes fenómenos de especiação que deram origem a novas espécies, com diferentes padrões de crescimento e estruturas de inflorescência (Heller, 1996). A figura 1.7. representa as diversas espécies dentro do género *Jatropha*.

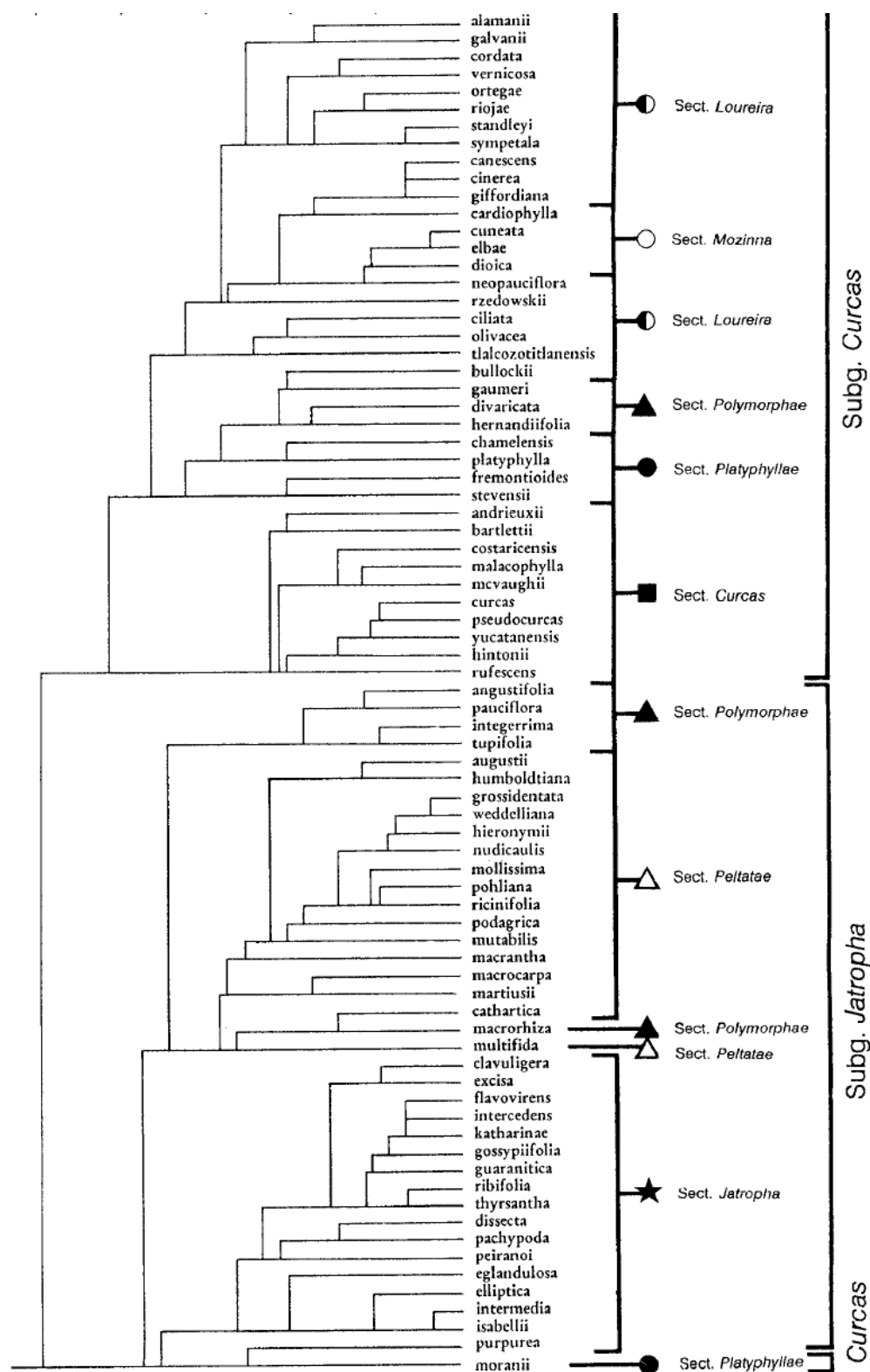


Figura 1.7. Espécies compreendidas no gênero *Jatropha*, distribuídas pela maior aproximação entre as mesmas (Heller, 1996).

A *Jatropha curcas* (JC) é uma planta resistente à seca, capaz de crescer em terrenos inóspitos, embora produza maior quantidade de biomassa sob condições ambientais favoráveis (Achten *et al.*, 2007), sendo sensível a condições de frio intenso ou excesso de água. Ocorre em áreas

com precipitação a partir de 250 mm por ano (Parawira, 2010), mas a nível mundial é mais abundante em regiões de savana tropical e em climas de monção (Achten *et al.*, 2010).

A sua altura média é de 4 metros, atingindo o máximo de produtividade ao final de 4-5 anos, e tendo uma vida média de 20 anos (Prueksakorn *et al.*, 2006), podendo atingir 40-50 anos (Garnayak *et al.*, 2008). As flores são pequenas e amarelo-esverdeadas, sendo o fruto uma cápsula com sementes escuras, lisas (figura 1.8.), onde se encontra uma amêndoa branca (Araújo *et al.*, 2007). O fruto tem um peso aproximado de 15 g, tendo a semente 2-4 g. Em média, cada árvore madura produz 3,5 quilogramas de sementes, por ano, quando cultivada sob condições ótimas (Parawira, 2010), sementes, essas, cujo conteúdo em óleo pode variar entre os 27 e os 40%. O rácio de flores masculinas e femininas por inflorescência é de 29:1, sendo que a polinização é geralmente assegurada por insetos da ordem Hymenoptera (Achten *et al.*, 2010)



Figura 1.8. Árvore e semente de *Jatropha curcas* (www.tradeleads.at).

Nas culturas de JC, os frutos são apanhados à mão, após a queda das folhas, e secos à sombra, sendo as sementes retiradas à mão.

Historicamente, os frutos de *Jatropha curcas* têm sido utilizados no tratamento da disenteria, de hemorroidas, gonorreia, infertilidade ou infeções cutâneas, assim como se regista o uso das folhas e do óleo com fins medicinais (Araújo *et al.*, 2007).

Contudo, é de notar a toxicidade da planta devido à presença de curcina, uma toxalbumina, ácido ciânico, ésteres de forbol, lectina, inibidores de tripsina, que a tornam imprópria para consumo humano ou animal (Achten *et al.*, 2007). Casos de intoxicação já foram registados com ratos, ovelhas ou cabras. Na ilha Maurícia, registou-se o caso do envenenamento de 11 crianças, devido à ingestão de frutos de purgueira (Parawira, 2010). Um dos componentes tóxicos, os ésteres de forbol, já revelou ação carcinogénica em experiências com ratos de

laboratório. No entanto, o óleo não tem propriedades mutagénicas e, portanto, não acarretará grandes problemas se cuidadosamente manuseado pelos trabalhadores.

De referir que, no México, existem algumas variedades de *Jatropha* com pouca ou nenhuma toxicidade (Achten *et al.*, 2010).

Se, por um lado, não se pode excluir os possíveis efeitos nefastos da plantação em massa de *Jatropha curcas*, como o associado ao consumo indevido dos frutos da mesma por parte de crianças, por outro, o facto de não ser apropriado para consumo abre perspectivas de aproveitamento do óleo da purgueira para produção de biodiesel, sem a sempre polémica questão de haver diminuição de recursos alimentares, facto muitas vezes apontado pela FAO ou associações ambientalistas quando se aborda o tema do biodiesel produzido a partir de sementes de oleaginosas habitualmente utilizadas na alimentação humana e animal.

1.2.2. Variabilidade Genética

O tamanho do genoma da *Jatropha* é relativamente pequeno, com somente 11 pares de cromossomas (figura 1.9.), comparando com outros membros da família Euphorbiaceae. O projeto “Jatropha Genome Project” fez a sequenciação do genoma da planta, tendo revelado que o mesmo possui cerca de 400 milhões de pares de bases – o próximo passo é a identificação dos genes associados à síntese de óleo ou à produção de curcina (Divakara *et al.*, 2010). O nível de diversidade genética nas populações de *Jatropha* merece atenção devido à sua introdução como espécie exótica em vários países, possivelmente associado ao efeito “bottleneck” (neste caso, uma pequena parte da população de *Jatropha* afastou-se da maior parte do grupo, quando recolhidas pelos marinhheiros, ficando isolada reprodutivamente e podendo ter perfil genético diferenciado – este pequeno grupo terá dado origem às variantes africanas e asiáticas da planta). A confirmação do “efeito fundador” poderia ser feita caso a caracterização das variedades africanas e asiáticas revelasse pouca diferença entre si, não havendo dados suficientes publicados sobre esta matéria (Achten *et al.*, 2010).

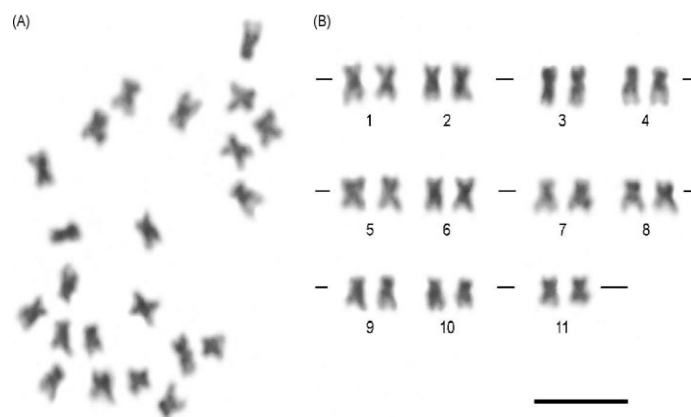


Figura 1.9. Cariograma da *Jatropha curcas*, com 22 cromossomas (Carvalho *et al.*, 2008).

No entanto, alguns estudos indicam pouca diversidade genética entre variedades do Mali, do Quênia e da Tanzânia (Achten *et al.*, 2010). O baixo polimorfismo pode promover a homozigotia e, conseqüentemente, diminuir o vigor da espécie, devido à expressão de alelos nocivos.

Estes aspetos devem ser levados em conta no caso do uso da *Jatropha* como fornecedor de óleo em grande escala para produção de biodiesel, sendo importante a caracterização genética das diferentes variedades existentes. Contudo, a pouca variabilidade genética não é obstáculo para que se observem grandes diferenças fenotípicas entre as variedades de *Jatropha*, que ganham mais relevância nas notáveis diferenças em relação à produtividade de diferentes plantas. Crê-se que a interação com o ambiente terá um papel muito importante na expressão das características da planta e, portanto, qualquer estudo deverá ter em conta as condições do meio onde a planta cresce, com o intuito de encontrar uma relação ótima que potencie a produtividade da *Jatropha curcas*. O cruzamento de variedades americanas com variedades africanas ou asiáticas pode ser um método eficaz de se obterem plantas com maior produtividade, devido à introdução de novos genes - aumento do vigor da espécie (Achten *et al.*, 2010).

A *Jatropha curcas* é tida como sendo boa candidata ao melhoramento do germoplasma, ou domesticação, devido à facilidade de propagação, à existência de um “pool” de genes nativo (variedades centro-americanas e mexicanas) e à precocidade (curta fase juvenil – cerca de dois meses e meio).

A toxicidade da planta pode também ser estudada com a identificação dos genes associados e possível manipulação genética para a criação de variedades não-tóxicas. No entanto, este aspeto deve ser cuidadosamente analisado dado que a resistência a várias pestes é também fruto da toxicidade da planta.

1.2.3. Usos da *Jatropha curcas*

Como já foi referido, a introdução da JC por humanos fora do continente americano terá sido devido às propriedades medicinais da planta. Porém, inúmeras possíveis utilizações para a planta são referidas. O mais comum é o uso como cerca viva pelo facto do seu carácter tóxico desencorajar a aproximação de animais e ser de fácil propagação (Heller, 1996). Também se regista o uso enquanto suporte de plantas trepadeiras como a baunilha ou as pimenteiras (Correia, 2009). A utilização do bagaço como fertilizante revelou impacto positivo em culturas experimentais de arroz. O consumo de folhas ou sementes de variedades mexicanas, com limitada ou inexistente toxicidade, tanto por humanos como por animais, é referido pela literatura (Heller, 1996). No sudoeste do Piauí, no Brasil, a plantação de *Jatropha curcas*, aí denominada de pinhão-mansão, ao redor das casas, tinha a função de proteger os residentes perante os maus espíritos (Heller, 1996). Extratos de várias partes da planta têm demonstrado atividade inseticida e moluscicida.

A JC é também utilizada em iniciativas de controlo da erosão do solo, lenha para cozinha doméstica e produção de carvão. Com o óleo pode-se fabricar sabões, produtos de cosmética ou óleo para iluminação.

1.2.4. A *Jatropha curcas* em Cabo Verde

Não é possível dizer com exatidão qual a data da introdução da *Jatropha curcas* em Cabo Verde. Porém, há indícios de que tal ocorreu pouco após o arquipélago começar a servir de escala nas viagens transatlânticas dos marinheiros europeus (Correia, 2009).

Nos finais do século XVIII, a planta já seria abundante nas encostas da ilha de Santiago, com relatos da exploração a nível local datados do início do século seguinte, seja da planta para sebes ou do óleo para iluminação (Heller, 1996).

A exploração comercial ter-se-á iniciado em 1836, com a exportação de sementes para os Estados Unidos, ocorrendo pouco depois a exportação para Portugal, onde foi utilizado para produção de sabões e iluminação, sendo o bagaço aproveitado como fertilizante de culturas de tomate (Gubitz *et al.*, 1998). Muitos decretos foram publicados no “Boletim Oficial de Cabo Verde”, a partir de 1843, promovendo o cultivo da purgueira. Em 1846 as sementes começaram a ser exportadas para outras regiões europeias, particularmente para a cidade de Marselha, com os mesmos fins (Heller, 1996).

A importância da purgueira na economia das ilhas era tal que foi recomendada a expansão do cultivo às ilhas de Santo Antão, Fogo e Brava, com o argumento de que as necessidades nutricionais da planta eram diminutas, sendo assim ideal para o solo semiárido e clima tropical seco que caracterizam o país (Correia, 2009).

Em 1934, havia, no arquipélago, aproximadamente 8748 hectares cobertos com purgueiras nas ilhas de Santiago, Boa Vista e Fogo, correspondendo a 16% da área cultivada, com rendimentos variáveis entre 200 e 800 kg de sementes/hectare (Furtado, 2007; Correia, 2009). Em 1944, a JC representou 74,1%, e em 1949, 83,5% do total de produtos agrícolas exportados por Cabo Verde para a Europa. Entre 1943 e 1958, esse valor nunca esteve abaixo dos 20%.

Entre 1901 e 1958, foi exportado um total de 46 000 t de purgueira, com o máximo a verificar-se em 1910, quando se exportaram 5602 toneladas. Os principais mercados eram o português, o francês e o inglês, como sempre para a indústria de sabão e para a iluminação pública.

Seguiu-se o declínio dos valores de exportação nos finais da década de 50 do século passado, tendo sucumbido na década de 60 face à concorrência de outras oleaginosas cultivadas noutras regiões do globo em grande escala. Por esta altura, a maioria das plantações foram-se degradando e algumas desapareceram (Furtado, 2007). Muitas plantações foram devastadas pela população local para serem aproveitadas como lenha, atendendo ao facto de já não gerarem quaisquer dividendos económicos (Correia, 2009).

Após a independência nacional, em 1975, os esforços desenvolvidos para combater a desertificação vieram acompanhados da reintrodução da purgueira, numa perspetiva de

encontrar fontes de rendimento para o crescimento da economia rural. Foram implantados projetos de exploração da purgueira nas ilhas do Fogo e de Santiago (Correia, 2009), além do “Projeto Integrado Fogo e Brava”, em cooperação com a GTZ (companhia de capital alemão que colabora com diversos estados, particularmente países em desenvolvimento, no desenvolvimento de projetos agrícolas e noutras áreas consideradas nucleares para melhor aproveitamento dos recursos desses estados).

Em 1989, a purgueira representou 5,9% da área reflorestada, tendo atingido 15% dessa área, em 1990 (Heller, 1996).

A partir de 1987, graças a estudos efetuados sobre a *Jatropha curcas*, em Cabo Verde, pelo Instituto Nacional de Investigação e Desenvolvimento Agrário, a introdução desta oleaginosa foi realizada em terrenos pré-tratados com socalcos, banquetas ou caldeiras em meia-lua, com o objetivo de retenção de maior quantidade de água, numa área superior a 100 hectares na ilha de Santiago (Furtado, 2007). Foi também estudada a reintrodução da planta num número maior de terrenos marginais ou considerados degradados, seguindo técnicas de retenção de água apropriadas. Foi estimada uma área de 87 955 hectares com potencialidades para a exploração da purgueira, englobando terrenos de zonas semiáridas e áridas de transição (Furtado, 2007). O último estudo, datado de 1988, estimou em apenas 36 000 hectares a área ocupada por purgueira, ocupando a acácia grande parte do terreno restante (Furtado, 2007).

Dos estudos efetuados, é notório que o devido aproveitamento dos terrenos disponíveis pode permitir que a produção de óleo de purgueira em Cabo Verde atinja números apreciáveis (Correia, 2009; Furtado, 2007). Furtado (2007) estimou que se poderia obter um total de 41 057 055 plantas que, com uma produção média de 0,7 kg de sementes/planta, permitiria obter 28 740 toneladas de sementes. Considerando uma percentagem de extração de 26%, o óleo obtido corresponderia a 7472 toneladas.

Atualmente, estima-se que, para além da *Jatropha curcas*, existem outras duas espécies do género *Jatropha* em Cabo Verde: a *Jatropha gossypifolia*, nas ilhas de Santo Antão, São Vicente, Santiago, Fogo e Brava, e a *Jatropha multifida*, em Santiago e Fogo. A *Jatropha curcas* é a predominante, ocorrendo em todas as ilhas.

O mais recente projeto de plantação de purgueira iniciou-se em 2010, na ilha do Fogo, estando incluído no “Plano Estratégico de Redução da Pobreza” (DNP-MF, 2010).

1.2.5. Vantagens e desvantagens da utilização da *Jatropha curcas*

As principais vantagens da utilização da purgueira consistem em:

- poder crescer em regiões semiáridas e solos pobres;
- poder ser cultivada ao lado de culturas de alto valor alimentar, servindo-lhes de proteção em relação aos animais e pestes;
- ser de fácil propagação;
- ter poucas exigências nutricionais;
- requerer pouco trabalho, exceto na colheita;

- tratar-se de uma planta que pode ocupar solos marginais;
- não ser comestível, não competindo com o fornecimento de alimentos, se usada para a produção de biodiesel;
- produzir sementes com elevado conteúdo em óleo.

A toxicidade das sementes para humanos e animais e a possibilidade de uso de terras adequadas para culturas alimentares no caso da massificação da produção de óleo de *Jatropha curcas* são as principais desvantagens (Parawira, 2010).

1.2.6. Potencial do óleo de *Jatropha curcas* para produção de biodiesel

Diferentes trabalhos têm apresentado diferentes valores na composição de ácidos gordos do óleo de *Jatropha curcas*, provavelmente devido a variações nas condições de cultivo, assim como à qualidade do solo ou à variedade da semente (Oliveira *et al.*, 2009). Em comparação com outros óleos, geralmente tidos em consideração, o óleo da purgueira mostra-se um bom candidato (quadro 1.2.).

Quadro 1.2. Perfil lipídico de diferentes óleos vegetais (Akbar *et al.*, 2009).

Ácido gordo	Óleo de <i>Jatropha curcas</i> (%)	Óleo de palma (%)	Óleo de girassol (%)	Óleo de soja (%)
Mirístico (C14:0)	0,1	1,1	n.d.	0,1
Palmitico (C16:0)	14,2	40,0	n.d.	11,0
Palmitoleico (C16:1)	0,7	n.d.	n.d.	n.d.
Esteárico (C18:0)	7,0	4,5	4,5	4,0
Oleico (C18:1)	44,7	39,2	21,1	23,4
Linoleico (C18:2)	32,8	10,1	66,2	53,2
Linolénico (C18:3)	0,2	0,4	n.d.	7,8
Eicosanóico (C20:0)	0,2	n.d.	0,3	n.d.
Saturados	21,6	49,9	11,3	15,1
Monoinsaturados	45,4	39,2	21,1	23,4
Polinsaturados	33,0	10,5	66,2	61,0

n.d. – não detetado

No óleo de semente de JC predominam os ácidos gordos monoinsaturados, seguidos dos polinsaturados, sendo o conteúdo em monoinsaturados superior ao dos outros óleos vegetais. Dado que os ácidos oleico e linoleico são os que estão presentes em maior quantidade, o óleo de JC pode ser classificado como oleico-linoleico (Akbar *et al.*, 2009). Estas características conferem ao óleo de purgueira algumas vantagens relativamente a outros óleos, não tendo um

ponto de fusão tão elevado quanto a palma, nem sendo tão propenso à oxidação quanto o óleo de girassol ou de soja, onde os ácidos polinsaturados constituem mais de 60% do total de ácidos gordos.

O índice de iodo, que é uma medida da insaturação do óleo, para o óleo de purgueira é inferior ao limite de 120g I₂/100 g óleo, estabelecido pela norma europeia EN 14214. Este facto é importante porque o biodiesel obtido a partir de óleo com índice de iodo elevado está associado à polimerização dos glicéridos aquando do aquecimento em motores, o que pode levar à formação de depósitos ou deterioração do seu poder lubrificante (Akbar *et al.*, 2009).

A percentagem de ácidos gordos livres tende a ser elevada nas diversas variedades de JC. Um valor acima de 1% pode causar problemas em caso de transesterificação alcalina (formação de sabões), mas um pré-tratamento via catálise ácida ou a transesterificação enzimática permitem ultrapassar esse obstáculo.

A elevada viscosidade, característica comum a outros óleos vegetais, é o principal entrave ao uso direto do óleo, sendo necessário que esta seja reduzida recorrendo às reações de transesterificação.

1.3. Métodos de Produção de Biodiesel

O método mais comum para a produção de biodiesel é, como já referido anteriormente, a transesterificação. Este processo consiste na reação dos triglicéridos do óleo com um álcool para produzir biodiesel e glicerol (Nazir *et al.*, 2009). A reação é geralmente realizada na presença de um catalisador – que pode ser alcalino, ácido ou enzimático. A transesterificação compreende 3 reações sucessivas (figura 1.10) o triglicérido é convertido em diglicérido, que por sua vez é convertido em monoglicérido e, por fim, em glicerol, havendo em cada passo libertação de um éster metílico ou etílico.

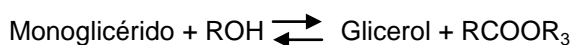
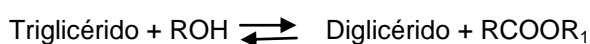


Figura 1.10. Sequência de reações que ocorrem aquando da transesterificação (Demirbas, 2005)

O álcool utilizado no processo de transesterificação pode ser metanol, etanol, propanol, butanol ou álcool amílico. O metanol tem sido o mais utilizado, devido ao seu baixo custo, mas também pela sua maior polaridade e cadeia mais curta que promovem uma reação mais rápida com o triglicérido (Leung *et al.*, 2010). O etanol obtido por via fermentativa seria o álcool preferencial para a reação de transesterificação, em relação ao metanol, por ter origem em produtos agrícolas (ao passo que o metanol é derivado do petróleo), ser renovável e acarretar menos

problemas ambientais (Demirbas, 2005). Contudo, o maior custo associado ao etanol e que constitui a principal condicionante do uso deste álcool em detrimento do metanol, deriva de estar maioritariamente disponível em mistura com a água, o que requer que seja submetido a um processo de desidratação antes da produção de biodiesel, encarecendo o processo (Antczak *et al.*, 2009).

A nível económico, o metanol é mais favorável, conforme se pode constatar pelos dados do quadro 1.3.

Quadro 1.3. Comparação das vias metilica e etilica para produção de biodiesel (Parente, 2003).

Quantidades e condições usuais - médias aproximadas	Vias do processo	
	Metilica	Etilica
Quantidade consumida de álcool por 1000 litros de biodiesel	90 kg	130 kg
Preço médio do álcool, US\$/kg	190	360
Excesso recomendado de álcool, recuperável, por destilação, após reação	100%	650%
Temperatura recomendada de reação	60°C	85°C
Tempo de reação	45 minutos	90 minutos

A estequiometria da reação de transesterificação é de 3 moles de álcool por mol de triglicérido. No entanto, para favorecer a reação no sentido da obtenção de ésteres e glicerol é usual usar-se excesso de álcool, sendo a alternativa a contínua remoção de um dos produtos da reação. A razão molar álcool:óleo de 6:1 é a mais usada a nível industrial (Nazir *et al.*, 2009).

Mais recentemente, tem sido divulgada a possibilidade de utilização de acetato de metilo ou acetato de etilo, carbonato di-metilo ou di-etilo na transesterificação ao invés de álcoois, principalmente devido ao efeito inibidor que os últimos demonstram ter sobre as lipases na transesterificação enzimática (descrita em 1.1.7) (Su *et al.*, 2011).

A utilização de solventes, e.g., butanol, hexano, éter petróleo, iso-octano, heptano ou ciclohexano é tida como um modo viável para aumentar a solubilidade do metanol e, por conseguinte, diminuir o seu potencial efeito inibitório sobre a lipase (Kumari *et al.*, 2009). A adição faseada de metanol também permite que a atividade catalítica da enzima seja afetada em menor grau, porém não é um método viável para a produção de biodiesel em grande escala (Talukder *et al.*, 2010).

As características do óleo devem ser previamente conhecidas de modo a estabelecer as condições reacionais que permitem obter o melhor rendimento em ésteres. Assim, para a transesterificação básica, o óleo deve ter um índice de acidez inferior a 1 e ser substancialmente anidro. No caso de um índice de acidez superior a 1, uma maior quantidade de catalisador será utilizado para neutralizar os ácidos gordos livres. A presença de água faz com que a reação de transesterificação se possa alterar no sentido da saponificação, produzindo sabão e reduzindo o teor de ésteres. Neste caso, haverá maior dificuldade na separação da fase dos ésteres da fase do glicerol, dado o aumento da viscosidade e a formação de géis (Parawira, 2010). A quantidade de água deve, portanto, ser mantida abaixo de 0,06% (m/m) (Nazir *et al.*, 2009). A neutralização por meio de uma solução de hidróxido de

sódio, seguida de separação da fase aquosa e secagem, é um processo que pode ser utilizado para reduzir o teor de ácidos gordos livres e o teor de água para os valores pretendidos (Parente, 2003).

Durante a reação de transesterificação, os reagentes formam inicialmente um sistema líquido de duas fases; a reação é controlada pela difusão, sendo que uma baixa difusão entre as fases resulta num progresso lento da reação. Assim que os ésteres metílicos ou etílicos se formam, estes atuam como solvente mútuo para os reagentes e forma-se uma única fase. O efeito da agitação é significativo durante a fase lenta da reação, tornando-se insignificante após a formação de uma só fase (Nazir *et al.*, 2009).

Após o fim da reação, a mistura obtida é composta por duas fases, uma menos densa, correspondente aos ésteres, e a outra mais densa correspondente ao glicerol, excessos de álcool, água e impurezas (Parente, 2003). Apesar dos ésteres metílicos serem o produto desejado da transesterificação, o aproveitamento do glicerol também pode ser importante, devido às suas diversas aplicações, na indústria cosmética e em sabões. No entanto, para a maior parte das aplicações o glicerol terá de passar por um refinamento prévio (Leung *et al.*, 2010).

Assim, os métodos utilizados para a realização da transesterificação dos triglicéridos são caracterizados de acordo com a natureza do catalisador: básico, ácido ou enzimático, sendo que os catalisadores básicos e ácidos podem ser homogêneos ou heterogêneos. Nas secções seguintes dar-se-á atenção a este métodos, mas também a mais recentes métodos de melhoramento do processo, seja não catalítico (condições supercríticas), seja associado às tradicionais formas de reação catalítica (micro-ondas, ultrassons).

1.3.1. Transesterificação com catalisadores químicos homogêneos

1.3.1.1. Transesterificação alcalina

A transesterificação na presença de catalisadores alcalinos é o método mais utilizado a nível industrial, devido à sua rapidez por comparação com a transesterificação ácida (refere-se na literatura que a catálise básica pode ser 4000 vezes mais rápida (Lam *et al.*, 2010)). Alguns dos catalisadores mais eficazes são o hidróxido de sódio e o hidróxido de potássio. O carbonato de potássio é outro catalisador referido na literatura como originando grande percentagem de ésteres, não tendo associado o problema de originar água, como no caso do hidróxido de sódio – isso porque origina bicarbonato, que não hidrolisa os ésteres (Demirbas, 2005). O baixo preço do hidróxido de sódio faz com que seja, geralmente, o catalisador escolhido. A transesterificação com catalisador alcalino adequa-se quando o óleo tem um baixo teor de ácidos gordos livres e água. A concentração do catalisador varia, geralmente, entre 0,5 e 1% da massa de óleo, produzindo entre 94 e 99% de ésteres metílicos ou etílicos, a uma temperatura de 55 a 70°C. Os catalisadores básicos são menos corrosivos para o equipamento industrial do que os ácidos, mas apresentam algumas desvantagens, tais como o grande

dispêndio de energia em relação à catálise enzimática, a dificuldade na recolha do glicerol, o facto do catalisador ter de ser removido do produto e a elevada suscetibilidade a ácidos gordos livres e água (Parawira, 2010; Nazir *et al.*, 2009).

1.3.1.2. Transesterificação ácida

Apesar da catálise ácida ser, em geral, uma reação muito lenta, com a duração de cerca de 20 horas a temperaturas superiores a 90°C (Lam *et al.*, 2010), os catalisadores ácidos podem ser usados para a transesterificação de triglicéridos, embora sejam mais comumente utilizados para óleos com um elevado teor de ácidos gordos livres, realizando a esterificação destes ácidos. Outra desvantagem é a elevada razão molar álcool:triglicéridos requerida, acima de 20:1. Embora o teor de ésteres obtido possa ser elevado, a corrosibilidade dos ácidos pode causar danos no equipamento (Parawira, 2010).

É referido que a catálise ácida pode ser mais económica do que a catálise básica quando a matéria-prima tem elevado teor de ácidos gordos livres, devido ao pré-tratamento a que o óleo terá de ser submetido no caso da transesterificação com um catalisador básico.

Os ácidos sulfúrico, sulfónico e clorídrico são os catalisadores mais utilizados, mas com maior predominância do ácido sulfúrico (Zhen *et al.* 2006).

1.3.2. Transesterificação com catalisadores químicos heterogéneos

Os catalisadores heterogéneos podem ser alcalinos ou ácidos, distinguindo-se por estarem num estado físico diferente daquele em que se encontra o óleo. Destacam-se o zircónio amorfo, o titânio, o potássio-zircónio ou o óxido de cálcio. Os catalisadores sólidos eliminam o custo adicional associado a catalisadores homogéneos, como o hidróxido de sódio, de remover o catalisador do produto após a reação (Parawira, 2010), sendo possível alcançar elevado teor de conversão.

O óxido de cálcio, que é um catalisador heterogéneo básico, quando tratado com carbonato de amónia, revelou elevada atividade catalítica na transesterificação de óleo de purgueira, tendo o teor de ésteres atingido uma percentagem de 93%. Este catalisador apresenta a vantagem de poder ser obtido a partir de um reagente barato como é o hidróxido de cálcio (Lam *et al.*, 2010). Catalisadores ácidos, como o estanho sulfatado, o óxido de zircónio ou o zircónio-tungsténio, foram testados com óleo de soja a uma temperatura de cerca de 200°C, tendo-se revelado como catalisadores promissores (Demirbas, 2005).

Os catalisadores ácidos sólidos apresentam a vantagem de poderem catalisar tanto a esterificação como a transesterificação, sendo úteis para óleos com elevado teor de ácidos gordos livres. Porém a reação é mais lenta pela mistura reacional constituir um sistema de 3 fases o que, por questões de difusão, inibe a reação (Leung *et al.*, 2010).

1.3.3. Transesterificação enzimática

O uso de enzimas como catalisadoras da reação de transesterificação tem vindo a ganhar protagonismo devido à elevada pureza do produto obtido e fácil separação do glicerol, além das menores necessidades energéticas por comparação com a catálise química (reação entre 20 e 60°C) (Parawira, 2010).

Dado que existe uma grande variedade de enzimas, estas encontram-se divididas em 6 classes (oxirredutases, transferases, liases, isomerases, ligases e hidrolases) e estas dividem-se, por sua vez, em várias subclasses. No caso de reações de transesterificação de triglicéridos, a subclasse das lipases (lipase de triacilglicerol ou triacilglicerol acil-hidrolase, nomes aceites pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular) é a mais adequada para o processo enzimático: pertence à classe de hidrolases carboxílico-ester, reconhecidas por atuarem sobre triacilgliceróis (triglicéridos) com formação de um diacilglicerol e libertação de uma molécula de água (Antczak *et al.*, 2009; Bajaj *et al.*, 2010). As lipases (E.C. 3.1.1.3.) estão envolvidas na quebra das ligações dos lípidos nas células dos organismos, sendo a capacidade de utilizar os mono, di e triglicéridos, para além dos ácidos gordos livres (realizam a esterificação, para além da transesterificação), os motivos para o estudo aprofundado do desempenho das lipases na transesterificação de óleos.

1.3.4. Transesterificação com recurso a ultrassons

O recurso a ultrassons tem sido considerado um bom método para melhorar a conversão em ésteres na catálise química e enzimática, pois promovem a transferência de massa entre líquidos imiscíveis, resultando num menor tempo de reação (Nazir *et al.*, 2009).

Os ultrassons são definidos como sons de frequência para além da capacidade auditiva do ser humano, que se situa no intervalo de 16 a 18 kHz, enquanto os ultrassons se prolongam dos 20 kHz aos 100 MHz (Lam *et al.*, 2010).

A irradiação de ultrassons (e.g., de 40 kHz) provoca a formação de bolhas na superfície de contacto entre os líquidos imiscíveis, cujo colapso perturba esta mesma fronteira e culmina na emulsificação do sistema. Além da diminuição do tempo de reação, a quantidade de catalisador necessária é duas a três vezes menor do que nos métodos convencionais (Nazir *et al.*, 2009), a razão molar álcool:óleo é minimizada e a energia consumida é reduzida (Lam *et al.*, 2010), pois a cavitação ocorrida provoca um aumento localizado de temperatura que promove a reação, sem que tenha de ser fornecida grande quantidade de energia (Leung *et al.*, 2010).

Apesar dos estudos utilizando os ultrassons não serem abundantes, os dados existentes apontam para uma melhoria da eficácia da reação de transesterificação, quando se utiliza lipases imobilizadas como catalisador, comportamento associado a uma redução de biodiesel e do glicerol adsorvidos no suporte de imobilização, facilitando o processo de reutilização da enzima (Lam *et al.*, 2010).

1.3.5. Transesterificação com recurso a micro-ondas

As micro-ondas também podem promover a reação de transesterificação, tendo como resultado uma maior conversão dos triglicéridos em ésteres, mínimo consumo de energia em relação a métodos convencionais de aquecimento e uma reação mais benéfica para o ambiente.

O processo convencional de aquecimento tem como desvantagens a sua dependência na condutividade térmica dos materiais, calor específico e densidade. Além disso, é um processo mais demorado, não havendo distribuição uniforme do calor. O contacto direto entre o recipiente onde decorre a reação, aquecido, e os reagentes pode resultar na decomposição do produto, especialmente quando o tempo de reação é prolongado.

As micro-ondas, por seu turno, transferem energia sob forma eletromagnética. A oscilação das radiações do campo das micro-ondas tende a fazer oscilar as terminações polares das moléculas e iões continuamente, o que provoca colisões e fricção entre as moléculas, gerando calor. Este calor é diretamente transferido para o meio de reação, resultando num rápido aumento da temperatura. Assim, uma maior quantidade de produto será obtida num menor tempo de reação.

A utilização de micro-ondas apresenta, também, as suas contrariedades, como a dificuldade na transposição da reação de pequena escala, num laboratório, para um projeto industrial, em grande escala (Lam *et al.*, 2010).

1.3.6. Transesterificação em condições supercríticas

A transesterificação em condições supercríticas é um processo onde não se recorre a catalisadores. A transesterificação decorre com o uso de metanol (ou etanol, propanol e butanol) supercrítico, que possibilita a formação de uma única fase, por contraste com as duas fases anteriormente referidas (1.3.), e que habitualmente se formam na mistura óleo/metanol à temperatura ambiente (Nazir *et al.*, 2009). Isso deve-se à relação existente entre os valores de temperatura e pressão com propriedades termofísicas do álcool, como a constante dielétrica, a viscosidade, o peso específico e a polaridade.

No caso do metanol, a temperatura crítica é de 512,2 K e a pressão crítica de 8,1 MPa (Demirbas, 2005).

A reação de transesterificação completa-se num curto período de tempo (menos de 10 minutos), e o facto de não se utilizar catalisadores torna o processo mais simples, sem necessidade de pré-tratamento ou posterior separação do catalisador em comparação com a catálise básica.

As elevadas temperatura e pressão exigidas, no entanto, fazem aumentar o investimento nos equipamentos e os custos energéticos, o que é um obstáculo à aplicação deste método em escala industrial.

1.4. Lipases

As lipases são enzimas produzidas por microrganismos (fungos e bactérias), animais e plantas. Porém, as preparações comerciais derivam, geralmente, dos microrganismos devido ao menor custo de produção e à mais fácil modificação das propriedades (Antczak *et al.*, 2009). Algumas das fontes mais utilizadas de lipases são: *Mucor miehei*, *Rhizopus oryzae*, *Candida antarctica*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas cepacia*, *Chromobacterium viscosum*, *Burkholderia cepacia*, *Enterobacter aerogenes*, *Thermomyces lanuginosus* ou *Rhizomucor miehei* (Bajaj *et al.*, 2009; Parawira, 2010). Dependendo da sua proveniência, as lipases terão características diferentes, não tendo a mesma lipase o mesmo desempenho sobre diferentes substratos, ou lipases diferentes o mesmo desempenho sobre o mesmo substrato (Antczak *et al.*, 2009).

Assim sendo, deve-se dar especial atenção às especificidades das lipases para a produção de biodiesel, particularmente à regioespecificidade e especificidade em relação ao substrato.

Em termos de regioesletividade, ou seja, a posição das ligações éster que as lipases tenderão a clivar, as lipases são divididas em 3 grupos: sn-1,3-*specific* (hidrolisam as ligações éster nas posições R1 e R3 do triglicérido) (figura 1.11.), sn-2-*specific* (hidrolisam a ligação éster na posição R2 do triglicérido) (figura 1.11.) e as não específicas (não distinguem entre as posições das ligações ésteres a serem clivadas) (Antczak *et al.*, 2009).

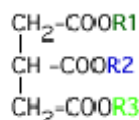


Figura 1.11. Representação de um triglicérido, com realce para as 3 cadeias de ácidos gordos representadas por R1, R2 e R3, em função da sua posição (www.sophim-sheabutter.com).

Idealmente, as lipases não-específicas (e suficientemente versáteis para reagirem com uma grande panóplia de substratos com cadeias de diferentes tamanhos) seriam as escolhidas para as reações de transesterificação, tendo, teoricamente, capacidade para originar um teor de ésteres de 100%. De entre as não específicas, destacam-se as lipases de *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas cepacia*, *Candida antarctica*, *Candida rugosa* e *Candida cylindracea* (Antczak *et al.*, 2009).

As sn-2-*specific* tendem a originar um biodiesel com elevado conteúdo de diglicéridos, não sendo consideradas entre as opções viáveis (Antczak *et al.*, 2009; Svensson *et al.*, 2011).

As sn-1,3-*specific* seriam pouco recomendadas, isto porque, em teoria, a transesterificação seria incompleta, potencialmente com uma elevada percentagem de monoglicéridos e pouco mais de 60% (m/m) de ésteres de ácidos gordos (Antczak *et al.*, 2009).

Contudo, algumas sn-1,3-*specific* têm revelado grande potencial na transesterificação de triglicéridos, registando-se a obtenção de teores de ésteres superiores a 90%, caso das lipases da *Rhizopus oryzae*, *Mucor miehei* ou *Thermomyces lanuginosus* (Antczak *et al.*, 2009). Crê-se que, nesses casos, ou há uma fraca especificidade sn-1,3 da lipase, ou ocorre a migração

espontânea do grupo acil. Essa migração ocorrerá no produto intermédio, relativamente instável, diglicérido sn-1,2 ou diglicérido sn-2,3, resultando diglicéridos sn-1,3 (Svensson *et al.*, 2011). Acredita-se que a migração pode ser provocada pelo suporte de imobilização, como no caso da Lipozyme TL IM (preparação comercial da *Thermomyces lanuginosus*, imobilizada em gel de sílica), ou por temperaturas mais elevadas de reação (Antczak *et al.*, 2009). Seja qual for a razão, o certo é que a migração do grupo acil faz aumentar o leque de lipases potencialmente capazes de gerar teores de ésteres bastante elevados, o que é importante porque, numa área onde o custo ainda é um dos principais condicionantes, pode haver mais alternativas à lipase comercial não-específica Novozym 435, cujo preço é bastante elevado (Juan *et al.*, 2011).

A especificidade em relação ao substrato consiste na capacidade de distinguir estruturas dos ácidos gordos como o tamanho da cadeia, o número, tamanho ou configuração das ligações duplas. Nas reações de triglicéridos com álcoois, as lipases distinguem o tamanho e tipo de ácido gordo contido no triglicérido e o tamanho da cadeia do álcool, sendo que estudos revelam que, no caso da *Rhizopus orizae*, há preferência por ácidos gordos C₁₈ e álcoois de C₂ a C₄ (Antczak *et al.*, 2009).

O uso de duas lipases com especificidades complementares pode permitir a obtenção de um teor elevado em ésteres (Bajaj *et al.*, 2010).

As lipases extracelulares têm sido as mais estudadas no processo enzimático de produção de biodiesel, nomeadamente na sua forma imobilizada. A imobilização da lipase num suporte físico apropriado permite a sua reutilização, o que diminui o custo do biodiesel obtido por transesterificação enzimática. São diversos os suportes de imobilização, como o gel de sílica, a resina acrílica, o alginato de sódio, a celulose, ou o diatomito (Tamalampudi *et al.*, 2008; Bajaj *et al.*, 2010). No entanto, a aplicação de lipases extracelulares acarreta alguns problemas no que diz respeito à purificação e imobilização para uso industrial. Assim, o uso de microrganismos, como sendo os próprios biocatalisadores, tem vindo a ser considerado como alternativa: ao invés de se extraírem as lipases, o próprio microrganismo é cultivado e imobilizado para ser utilizado na reação de transesterificação, sendo hoje possível que microrganismos sejam alterados geneticamente para produzirem uma maior quantidade de enzima (Bajaj *et al.*, 2010). O processo de transesterificação enzimática, utilizando as lipases intracelulares de microrganismos, como fungos ou bactérias, tem associado um menor custo por não haver necessidade de complexas etapas de purificação antes da utilização (Parawira, 2010; Bajaj *et al.*, 2010). Os microrganismos produtores de lipases para a reação de transesterificação são geralmente imobilizados em partículas de suporte da biomassa (BSP), como acontece com o fungo *Rhizopus orizae* (Tamalampudi *et al.*, 2008). O tratamento das células imobilizadas em BSP com glutaraldeído demonstrou aumentar a estabilidade das mesmas, sendo menor a perda de atividade catalítica após várias reutilizações (Ban *et al.*, 2002).

O desempenho das lipases é influenciado por diversos fatores, podendo ser inativadas pelo uso de álcoois de cadeia curta (metanol ou etanol), o que significa que uma particular atenção deve ser dada à razão molar álcool:óleo utilizada aquando do processo enzimático. A

temperatura da reação enzimática é inferior à da catálise química, sendo que temperaturas demasiado elevadas tendem a causar desnaturação da lipase. O conteúdo ideal de água na mistura reacional varia de lipase para lipase, sendo, geralmente, uma quantidade mínima necessária para que a enzima permaneça na conformação ativa. O pH do meio também pode fazer variar a atividade catalítica da lipase, particularmente em meios reacionais não-aquosos. O glicerol, um dos produtos da reação de transesterificação, possui também um efeito inibidor sobre a lipase, sobretudo se imobilizada, por ser adsorvido no suporte de imobilização (Antczak *et al.*, 2009).

A possibilidade de reutilização, menores necessidades energéticas, possibilidade de uso de óleo não refinado, natureza biodegradável dos catalisadores, separação facilitada do produto e ausência de saponificação são algumas das principais vantagens do uso de lipases na transesterificação de triglicéridos para obtenção de biodiesel.

2. Materiais e Métodos

2.1. Matérias-primas

As sementes de *Jatropha curcas* (JC) utilizadas na produção de biodiesel foram provenientes de Cabo Verde, nomeadamente das ilhas de Santiago e Fogo, onde esta espécie se encontra em maior abundância. Nos ensaios iniciais de caracterização do óleo e produção de biodiesel via catálise básica, utilizaram-se sementes importadas em abril de 2010 (cerca de 3 quilos). Posteriormente, em agosto do mesmo ano, uma maior quantidade (cerca de 10 quilos) foi importada para que se pudessem efetuar mais ensaios, destacando-se a otimização do processo de produção de biodiesel por via enzimática.

Nas figuras 2.1., 2.2 e 2.3. veem-se algumas das sementes utilizadas neste trabalho.



Figura 2.1. Sementes de *Jatropha curcas* com a cápsula protetora.



Figura 2.2. Sementes de *Jatropha curcas* com casca.



Figura 2.3. Amêndoa das sementes de *Jatropha curcas*.

2.2. Reagentes

Nos diferentes métodos de extração/caracterização do óleo e produção/caracterização do biodiesel recorreu-se aos seguintes reagentes:

- Metanol (pureza 99,8%; Panreac)
- Etanol (pureza 99,5%; Panreac)
- Iso-octano (pureza 99%; Panreac)
- Heptano (pureza 99%; Riedel-de Haen)
- Ácido clorídrico 0,5 M (Riedel-de Haen)
- Ácido clorídrico 0,1 M (Riedel-de Haen)
- Tiosulfato de sódio 0,1 M (Riedel-de Haen)
- Ácido acético (pureza 99,8%; Riedel-de Haen)
- Ácido clorídrico 37% (Riedel-de Haen)
- Reagente Folin-Ciocalteu (Panreac)
- Ácido sulfúrico 95-97% (Sigma-Aldrich)
- Éter etílico (pureza 99,5%; Absolve)
- Reagente de Wijs 0,1 M (Panreac)
- Ácido fosfórico (Panreac)
- Hexano (pureza 99%, Sigma-Aldrich)
- Hidróxido de sódio (pureza 98%, Absolve)
- Hidróxido de potássio (pureza 86%, Absolve)
- Óxido de cálcio (Riedel-de Haen)
- Heptadecanoato de metilo (Fluka)
- Novozyme 435, não específica (Novozymes)
- Lipozyme TL IM, sn-1,3-específica (Novozymes)
- Lipozyme 100L, sn-1,3-específica (Novozymes)
- Albumina de soro bovino (Merck)
- Solução de trifluoreto de boro (Riedel-de Haen)
- Sulfato de sódio anidro comercial

- Molibdato de sódio
- Fosfato
- Sulfato de hidrazina
- Sulfato de cobre (pureza 99%, Merck)
- Carbonato de sódio (pureza 99,8%, Merck)
- Tartarato duplo de sódio e potássio (Panreac)
- Iodeto de potássio (pureza 99,5%, Panreac)
- Cloreto de sódio (Fischer Scientific)
- Ciclo-hexano (pureza 99,5%, Riedel-de Haen)
- Amido (Merck)
- Suporte de poliamida EP700
- Material corrente de laboratório

2.3. Equipamentos

Nos diferentes métodos de extração/caracterização do óleo e produção/caracterização do biodiesel utilizou-se os seguintes equipamentos:

- Manta de aquecimento para Soxhlet (P-Selecta)
- Prensa mecânica (Skeppsta Maskin AB oil press, 40C)
- Banho termostatzado (P-Selecta)
- Aparelho para obtenção de água ultrapura (Millipore, Elix S, Progard 2)
- Mufla (Heraeus)
- Estufa (Mettmert)
- Centrífuga (Biofuge 28RS, Heraeus Sepatech)
- Centrífuga (Avanti J-25 I, Beckman)
- Centrífuga (Himac – CT15E, WWR)
- Suporte para balões de destilação, com aquecimento (Gerhardt)
- Placa de agitação, “vórtex” (VF2, Janke & Kunkel)
- Balanças de precisão: AB204-S, Mettler Toledo; ABJ, Kern; Mettler PM4600, Delta Range
- Aparelho Karl-Fischer coulométrico (831 KF-Colometer, Metrohm)
- Evaporador rotativo (Banho de aquecimento: B-490; Controlador de vácuo: V-800; Rotavapor: R-200)
- Incubadora (Lab-line Orbit)
- Incubadora (New Brunswick Scientific)
- Aparelho para determinação do ponto de inflamação (Petrotest, Series 3)
- Aparelho para determinação da estabilidade oxidativa (743 Rancimat, Metrohm)
- Placa de aquecimento (VMS-C7, WWR)
- Filtro de papel (Whatman 150 mm)
- Filtro de papel (Sartorius)
- Espectrofotômetro (U-2000, Hitachi)

- Cromatógrafos (Varian CP-3800; HP 5890)
- Picadora tipo “1,2,3” (Choppi Maxi, Ariete)

2.4. Métodos de caracterização das sementes

2.4.1. Teor de água e matérias voláteis

Para a determinação do teor de água e matérias voláteis em sementes oleaginosas, seguiu-se o seguinte procedimento, que se encontra descrito na norma ISO 665:2000.

- Secaram-se cápsulas de fundo plano, com as respectivas tampas, durante uma hora a 103°C numa estufa.
- Pesaram-se as cápsulas com as tampas, depois de terem ficado durante 30 minutos no exsiccador, à temperatura ambiente.
- As sementes de JC foram marteladas, obtendo-se partículas de menores dimensões, tendo-se pesado, posteriormente, 5 g em cada cápsula (ações realizadas em triplicado).
- As mesmas cápsulas foram colocadas numa estufa a 103°C, tendo lá permanecido de um dia para o outro. Efetuou-se a pesagem das cápsulas após arrefecimento num exsiccador.
- Voltou-se a colocar as caixas de Petri na estufa a 103°C, durante uma hora, como forma de certificar que toda a água teria sido eliminada. Pesou-se após secagem no exsiccador.

O teor de água e matérias voláteis foi obtido pela equação (2.1.):

$$w (\%) = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100 \quad (2.1)$$

onde:

m_0 – massa, em gramas, do conjunto cápsula/tampa

m_1 – massa, em gramas, do conjunto cápsula/tampa com a toma para análise, antes da secagem

m_2 – massa, em gramas, do conjunto cápsula/tampa com a toma para análise, depois da secagem

Tomou-se como teor de água e matéria voláteis a média aritmética das 3 determinações.

2.4.2. Teor de óleo

2.4.2.1 Extração em Soxhlet

O extrator soxhlet (figura 2.4.) é um dos equipamentos mais utilizados para a extração de componentes solúveis de uma amostra devido ao fácil manuseamento, baixo custo do equipamento e possibilidade de maior extração de massa (Castro *et al.*, 2010).

A extração soxhlet consiste em retirar de uma amostra sólida um componente que tenha alguma solubilidade no solvente utilizado, sendo os restantes componentes indesejáveis (impurezas) insolúveis no solvente. A amostra sólida é mantida num reservatório de vidro que tem acoplado, por cima, um condensador (onde circula água fria) e por baixo um frasco de destilação (onde é colocado o solvente) que é aquecido. Quando o solvente ferve e emerge em forma de vapor, é novamente condensado ao chegar à parte superior, precipitando-se no reservatório de vidro onde se encontra o cartucho com a amostra sólida – aqui ocorre a extração. O reservatório tem ao lado um sifão que, simultaneamente, também se enche com o solvente, tendo uma ligação com o frasco de destilação em baixo. Ao transbordar, o sistema está concebido para que todo o solvente no reservatório seja devolvido ao contentor inicial: o frasco de destilação, desta vez com os componentes solúveis extraídos dissolvidos no mesmo. Inicia-se depois um novo ciclo, sendo o solvente reutilizado tantas vezes quantas as necessárias até que se considere terminada a extração.



Figura 2.4. Montagem para a extração soxhlet: extratores com os cartuchos que contêm as sementes moídas ligados a balões de destilação e condensadores; por baixo, a manta de aquecimento.

No caso da extração de óleo nas sementes de JC, seguindo a norma ISO 659:1998. O procedimento laboratorial foi o seguinte:

- a) Os balões de destilação ficaram 30 minutos na estufa a 103°C, visando a eliminação de água residual.

- b) As sementes foram trituradas numa máquina de moer café, tendo sido pesadas entre 12 e 15 gramas de semente moída num cartucho de celulose (ação realizada em triplicado). Colocou-se algodão por cima das amostras e o cartucho foi colocado na câmara localizada dentro do extrator soxhlet.
- c) Colocou-se 140 ml de solvente (hexano) no balão de destilação.
- d) Montou-se o condensador, o extrator e o balão de destilação.
- e) Ligou-se a manta de aquecimento, deixando a extração decorrer durante 4 horas.
- f) Decorridas as 4 horas, o procedimento foi interrompido, sendo retirado o cartucho de dentro do extrator e revolvida a semente moída.
- g) Reiniciou-se o processo por mais uma hora.
- h) No final, o balão de destilação, com o líquido obtido, foi levado a um evaporador rotativo com o intuito de eliminar o hexano; a temperatura era de 40°C, com pressão de 210 mbar.
- i) Secou-se o balão numa estufa a 103°C durante uma hora, seguindo-se o arrefecimento num exsicador. Pesou-se o balão com o óleo obtido.

O teor de óleo foi determinado pela equação (2.2):

$$w_o (\%) = \frac{m_1}{m_0} \times 100 \quad 2.2$$

onde:

m_0 – massa, em gramas, da porção teste

m_1 – massa, em gramas, do óleo extraído

2.4.2.2. Extração Mecânica

A extração de óleo por intermédio de uma prensa mecânica (figura 2.5.) foi o processo usado para a obtenção de uma maior quantidade de óleo de JC. No processo de extração com solvente, em Soxhlet, apenas se extraía óleo de cerca de 12 g de sementes na extração, enquanto no processo de prensagem se extraiu óleo de até 4 kg de sementes por utilização de uma prensa mecânica.

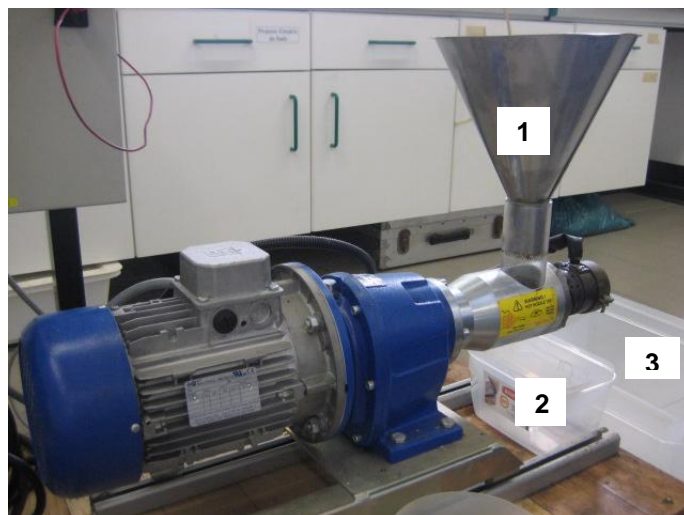


Figura 2.5. Prensa mecânica utilizada na extração dos óleos, com representação da tremonha onde se introduzem as sementes (1), do recipiente onde se acumula o óleo extraído (2) e do recipiente onde se acumula o bagaço (3).

Durante a prensagem as sementes eram introduzidas na tremonha e, simultaneamente, esmagadas e transportadas na direção de uma reserva constituída por um parafuso sem-fim. Como a secção de introdução é preenchida lentamente com sementes, a primeira etapa do processo consiste em eliminar o ar entre o material. Assim que os espaços vazios entre as sementes diminuem as sementes começam a resistir à força aplicada por meio de contacto mútuo e deformam. A pressão acumulada faz com que óleo seja retirado do material sólido no interior do bagaço (Beerens *et al.*, 2009).

Utilizou-se seletores de pressão diferentes, um com uma boca de tubulação de 10 mm (maior pressão) e outro com uma boca de tubulação de 14 mm (menor pressão). A pressão resultante, de diferente ordem, teria reflexos na percentagem de óleo extraído. O óleo das sementes de Santiago e do Fogo foram extraídas segundo esse método, com a utilização sequencial dos seletores de pressão acima indicados.

O óleo obtido ainda continha uma quantidade elevada de sólidos. Deixou-se o material sólido sedimentar durante alguns dias, tendo-se formado uma camada acastanhada no fundo do recipiente. Retirou-se depois o óleo, já com maior qualidade, que se encontrava na fase superior. Este óleo foi submetido, ainda, a um processo de filtração, antes de ter sido utilizado nos ensaios subsequentes.

2.5. Métodos de pré-tratamento do óleo

Antes de se proceder à caracterização do óleo extraído das sementes de JC, e à sua utilização nas reações de transesterificação, foi necessário realizar alguns passos de pré-tratamento, nomeadamente, a degomagem e a neutralização.

2.5.1. Degomagem

Os óleos brutos apresentam, geralmente, inúmeras impurezas, gomas (fosfatídeos) e outros compostos coloidais que podem promover a hidrólise do óleo (aumento dos ácidos gordos livres) durante o armazenamento (Beerens *et al.*, 2009), levando a perdas durante a transesterificação.

A degomagem visa a eliminação, remoção ou inativação de fosfatídeos e demais substâncias (Vieira *et al.*, 2009). É um método relevante para que o teor de fósforo no óleo e, consequentemente, no biodiesel dele derivado possa cumprir a norma EN 14214 (ver 2.6.4.).

Foram empregues 2 métodos de degomagem, a degomagem com água (D.A.) e a degomagem “especial” (D.E.), onde além de água se recorre a ácido fosfórico. A D.A. garante a eliminação de fosfatídeos hidratáveis, enquanto na D.E. se procura efetuar também a remoção dos fosfatídeos não-hidratáveis.

Técnica de Ensaio

- **Degomagem com Água**

- a) Aqueceu-se uma amostra de óleo a 60°C
- b) Adicionou-se 5 % (m/m) de água, em função da amostra de óleo.
- c) A solução ficou em agitação durante 30 minutos, a 250 rpm.
- d) Seguiu-se a centrifugação para a separação de fases: 18 592 g, durante 20 minutos a uma temperatura variável de 15 a 20°C.
- e) O sobrenadante (óleo) foi depois levado ao evaporador rotativo para eliminação da água eventualmente presente. A temperatura do aparelho era de 40°C e a pressão de 120 mbar. Alternativamente, usou-se sulfato de sódio anidro para eliminar a água.

- **Degomagem Especial**

O procedimento foi semelhante à D.A., exceto nas alíneas b) e c). Na D.E. adicionou-se ao óleo aquecido 0,2 % (m/m) de ácido fosfórico, tendo a solução ficado em agitação durante 5 minutos. Findo o tempo acrescentou-se 5 % (m/m) de água, agitando-se durante mais 25 minutos.

2.5.2. Neutralização

A neutralização consiste na remoção dos ácidos gordos livres (AGL) presentes no óleo, mediante a presença de hidróxido de sódio. Esta base formará sabões após reação com os AGL, que serão removidos após separação de fases. Outras substâncias indesejáveis, como produtos da oxidação dos ácidos gordos, fosfatídeos residuais, látex e fenóis também poderão ser eliminadas (Beerens *et al.*, 2009).

A neutralização permite a diminuição do índice de acidez, conforme determinado em 2.6.1.

Reagentes

- a) Solução aquosa de hidróxido de sódio – preparou-se soluções de NaOH com molaridade entre 1 e 5 N, i.e., dissolveu-se entre 4 e 20 gramas de NaOH em 100 ml de água.

Técnica de Ensaio

- a) Adicionou-se 2 % (m/m) de uma solução de NaOH de molaridade conhecida a uma amostra de óleo.
- b) Agitou-se durante uma hora a 250 rpm e 60°C.
- c) Procedeu-se à separação de fases através de uma centrifugação.

2.6. Métodos físico-químicos de caracterização do óleo e do biodiesel

2.6.1. Índice de Acidez

O índice de acidez é definido como a massa de hidróxido de potássio, expressa em miligramas, necessária para neutralizar os ácidos gordos livres contidos num grama de gordura, óleo ou biodiesel. Trata-se de um dos parâmetros de caracterização do biodiesel regulamentados pela norma europeia EN 14214, sendo o limite máximo admitido de 0,5 mg KOH/g biodiesel.

A sua determinação faz-se pela norma portuguesa NP-903, consistindo na neutralização, por titulometria ácido-base, dos ácidos gordos livres contidos numa amostra de óleo ou biodiesel.

Neste trabalho, o índice de acidez foi determinado tanto para os óleos de JC, como para o biodiesel. O procedimento utilizado foi o seguinte:

Reagentes

- a) Mistura dissolvente – mistura em volumes iguais de etanol absoluto e éter etílico, neutralizada com uma solução 0,1 N de hidróxido de potássio (KOH), utilizando-se solução alcoólica de fenoltaleína enquanto indicador. Na neutralização utilizou-se a menor quantidade possível de solução de KOH, somente o suficiente para se obter um ligeiro tom rosado.
- b) Solução aquosa de hidróxido de potássio (0,1 N) – dissolveu-se 0,281g de KOH em água destilada para um volume de 50 ml. Os valores foram alterados no caso de ser expectável um índice de acidez muito baixo, sendo preparada uma solução com uma molaridade inferior (0,05 ou 0,01 N) para que a determinação precisa do índice de acidez fosse facilitada.

Técnica de Ensaio

- Pesou-se, em triplicado, cerca de 2 gramas de óleo.
- Adicionou-se 50 ml de mistura dissolvente, adicionando duas gotas de fenolftaleína.
- Procedeu-se à titulação com a solução aquosa de hidróxido de potássio, sob agitação, até à obtenção de um tom rosado persistente.

Padronização do Titulante

Com o objetivo de corrigir eventuais erros na preparação da solução aquosa de KOH, fez-se a padronização da solução referida recorrendo a uma solução de ácido clorídrico (padrão Titrisol), de molaridade 0,1 N.

Titula-se, com a solução de KOH, duas tomas de 10 ml de ácido clorídrico (0,1 N) onde se adicionou duas gotas do indicador fenolftaleína.

A normalidade da solução aquosa de KOH foi determinada pela equação (2.3):

$$N_{\text{KOH}} = \frac{V_{\text{HCl}} \times N_{\text{HCl}}}{V_{\text{KOH}}} \quad 2.3$$

onde:

V_{KOH} – volume da solução de KOH (ml)

V_{HCl} – volume da solução padrão de HCl (ml)

N_{HCl} – normalidade da solução padrão de HCl (N)

Cálculo do Índice de Acidez

O índice de acidez (IA) foi calculado pela equação (2.4.):

$$\text{IA (mgKOH/g)} = \frac{(V \times N \times 56,11)}{m} \quad 2.4$$

V – volume da solução de KOH (ml)

N – normalidade da solução aquosa de KOH (N)

m – massa da toma de amostra de óleo ou biodiesel (g)

56,11 – massa equivalente do KOH (g/eq)

Em alternativa, a percentagem de acidez pode ser expressa em função do ácido oleico, de acordo com a equação (2.5):

$$\text{acidez (\% ácido oleico)} = \frac{(V \times N \times 282,45)}{m \times 10} \quad 2.5$$

onde:

282,45 – massa equivalente do ácido oleico (g/eq)

10 – fator de conversão para percentagem

V – volume da solução de KOH (ml)

N – normalidade da solução aquosa de KOH (N)

m – massa da toma de amostra de óleo ou biodiesel (g)

A percentagem de acidez em função do ácido oleico é particularmente relevante nos cálculos estequiométricos relativos à transesterificação ácida.

2.6.2. Índice de Saponificação

O índice de saponificação (IS) corresponde à massa de hidróxido de potássio, expressa em miligramas, necessária para saponificar os ácidos gordos e glicéridos contidos numa amostra de óleo. A sua determinação faz-se mediante o método 920.160, descrito no “Official Methods of Analysis of the AOAC”.

De acordo com o supracitado método, o procedimento laboratorial foi o descrito seguidamente:

Reagentes

- a) Solução alcoólica de hidróxido de potássio – juntou-se, num almofariz, 10 g de KOH e 11,25 g de óxido de cálcio (CaO), reduzindo-os seguidamente a pó. Adicionou-se ao almofariz cerca de 100 ml de etanol absoluto, tendo depois a mistura sido transferida para um balão, lavando sucessivamente o almofariz com porções de etanol. Adicionou-se, ao balão, etanol, de modo a perfazer 250 ml e agitou-se durante 5 minutos com o auxílio de uma barra magnética. Durante o dia o balão foi sujeito a várias inversões sucessivas, findas as quais a solução repousou até ao dia seguinte, quando a solução foi filtrada.

Técnica de Ensaio

- a) Pesou-se, em triplicado, para balões esmerilados de 250 ml, tomas de amostra de cerca de 2 g de óleo.
- b) Adicionou-se 25 ml da solução alcoólica de hidróxido de potássio, juntando 3 reguladores de ebulição.
- c) Destilou-se em refluxo durante 30 minutos até saponificação completa da gordura. Deixou-se arrefecer a solução.
- d) Titulou-se com uma solução de ácido clorídrico de molaridade 0,5 N (padrão Titrisol), o que foi precedido da adição de duas gotas do indicador de fenolftaleína, até atingir uma tonalidade amarelada.
- e) Paralelamente, realizou-se um ensaio “branco”, i.e., sem amostra de óleo.

Cálculo do Índice de Saponificação

O índice de saponificação (IS) foi calculado pela equação (2.6):

$$IS \text{ (mg KOH/g)} = \frac{((V_b - V_a) \times N \times 56,1)}{m} \quad 2.6$$

onde:

V_a – volume de HCL gasto na titulação da amostra (ml)

V_b - volume de HCL gasto no ensaio em branco (ml)

N – normalidade do HCL (N)

m – massa da toma de amostra (g)

2.6.2.1 Peso Molecular

No que diz respeito aos óleos, o cálculo do peso molecular (PM) é fundamental para que se efetuem os cálculos estequiométricos relativos à transesterificação alcalina. Pode ser determinado em função do IS, de acordo com a equação (2.7) (norma AOCS Cd 3-52):

$$PM \text{ (g.mol}^{-1}\text{)} = \frac{56000 \times 3}{IS} \quad 2.7$$

2.6.3. Índice de Iodo

O índice de iodo (II) permite estabelecer o grau de insaturação de óleos e de misturas de ésteres metílicos de ácidos gordos. Sendo determinado pela norma europeia EN 14111, consiste numa reação entre o óleo e uma solução de um halogéneo. O halogéneo em excesso irá oxidar uma solução de iodeto convertendo-o em iodo livre, cuja quantidade é determinada posteriormente por titulação com tiosulfato de sódio.

Um ensaio “branco” permite, por diferença, determinar a quantidade de halogéneo que reagiu com a amostra. É a essa quantidade de halogéneo absorvida pela amostra que corresponde o índice de iodo, expresso em gramas de iodo por 100 g de amostra.

A norma EN 14214 estabelece como limite máximo para o índice de iodo num biodiesel o valor de 120 g Iodo/100 g de amostra.

O procedimento experimental foi o descrito seguidamente:

Reagentes

- a) Solução de iodeto de potássio (100 g/l) – dissolveu-se 10 g de KI em 100 ml de água destilada.
- b) Indicador de cozimento de amido – dissolveu-se 0,5 g de amido em 3 ml de água ultrapura fria até a formação de uma mistura pastosa e juntou-se 100 ml de água a ferver. A solução foi depois submetida a 3 minutos de fervura e deixou-se arrefecer.

- c) Solução de tiosulfato de sódio (0,1 N) – utilizou-se padrão Titrisol dissolvido em água destilada.
- d) Solvente – misturou-se partes iguais de ciclo-hexano e ácido acético glacial, dependendo o volume do número de amostras a analisar.

Técnica de Ensaio

- a) Para evitar problemas inerentes à oxidação, as amostras de óleo foram secas com recurso ao sulfato de sódio anidro.
- b) Pesou-se entre 0,13 e 0,15 g de amostras de óleo, em duplicado, transferindo-as, com o auxílio de 20 ml de solvente, para frascos rolhados de 500 ml.
- c) Adicionou-se 25 ml de reagente de Wijs, agitou-se e guardou-se os frascos no escuro por uma hora.
- d) Adicionou-se 20 ml de iodeto de potássio e 150 ml de água.
- e) Titulou-se com a solução de tiosulfato de sódio até se atingir uma tonalidade amarelada, altura em que se adicionou 0,5 ml do indicador de cozimento de amido à solução. Prosseguiu-se a titulação até desaparecer a cor azul sob forte agitação.
- f) Realizou-se um ensaio “branco”.

Cálculo do Índice de Iodo

O índice de iodo das amostras em estudo foi determinado através da equação (2.8):

$$II \text{ (g I}_2\text{/100g)} = \frac{((V_b - V_a) \times c \times 12,69)}{m} \quad 2.8$$

correspondendo:

V_a – volume de tiosulfato de sódio gasto na titulação da amostra (ml)

V_b – volume de tiosulfato de sódio gasto no ensaio em branco (ml)

c – concentração do tiosulfato de sódio (N)

m – massa da amostra de óleo (g)

12,69 – fator procedente da razão entre a constante k (número de eletrões transferidos) e M_I (massa molar do iodo) (Leal *et al.*, 2008)

Cálculo do Índice de Iodo Teórico

Um método alternativo para o cálculo do índice de iodo é recorrer à percentagem mássica de ésteres metílicos, cuja determinação é pormenorizadamente abordada nos pontos 2.6.8.1 a 2.6.8.3. Este método encontra-se descrito na norma europeia EN 14214:2008, anexo B.

A contribuição individual dos ésteres para o índice de iodo total obtém-se pela multiplicação da percentagem mássica do éster por um fator respetivo – esse fator é tanto maior quanto maior o número de ligações duplas, i.e., quanto maior a insaturação, sendo que, nos ésteres com o

mesmo número de ligações duplas, o fator é menor para o que tem a cadeia mais longa; os ésteres saturados têm fator igual a 0 (quadro 2.1.).

O índice de iodo total é, assim, o somatório das contribuições individuais de todos os ésteres.

Quadro 2.1. Fatores de Multiplicação dos ésteres metílicos de ácidos gordos para determinação do índice de iodo (EN 14214:2008).

Éster Metílico	Fator de Multiplicação
Éster Metílico de Ácidos Gordos Saturados	0
Hexadecanoato de Metilo (C16:1)	0,950
Octadecanoato de Metilo (C18:1)	0,860
Octadecadienoato de Metilo (C18:2)	1,732
Octadecatrienoato de Metilo (C18:3)	2,616
Eicosenoato de Metilo (C20:1)	0,785
Docasenoato de Metilo (C22:1)	0,723

2.6.4. Teor de Fósforo

O teor de fósforo nos óleos foi determinado, colorimetricamente, seguindo a norma portuguesa NP 1994:2000, após calcinação da amostra. O fósforo encontra-se nos óleos como elemento constituinte dos respetivos glicerofosfolípidos, tornando-se necessário libertá-lo para que possa ser corretamente determinado. A matéria orgânica é destruída na presença de óxido de zinco, sendo o resíduo obtido dissolvido em ácido clorídrico. O ortofosfato libertado reagirá então com molibdato de sódio formando ácido molibdofosfórico, que na presença de hidrazina (agente redutor) origina um composto de fósforo e molibdénio de cor azul.

A norma EN 14214:2008 especifica um valor máximo de fósforo de 4,0 mg/kg de amostra.

Reagentes

- Solução de hidróxido de potássio (50 g/100 ml) – dissolveu-se, num balão de 100 ml, 50 g de KOH em 100 ml de água destilada.
- Solução de molibdato de sódio – num balão de 500 ml, preenchido com 300 ml de água destilada, adicionou-se 140 ml de ácido sulfúrico concentrado. Quando o líquido arrefeceu, dissolveu-se 12,5 g de molibdato de sódio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e completou-se o volume com água destilada. Esta solução ficou em repouso durante 24 horas.
- Solução-padrão de fósforo (0,01 mg/ml) – secou-se fosfato monopotássico durante duas horas em estufa a 103°C, deixou-se arrefecer em exsiccador e pesou-se 1,0982 g num balão volumétrico de 250 ml. Dissolveu-se em água destilada e completou-se o volume, tendo resultado uma solução-mãe com uma concentração de 1 mg de fósforo

por mililitro. Fez-se uma diluição 1:100 da solução-mãe, obtendo-se uma solução-padrão com 0,01 mg/ml de concentração.

- d) Solução de sulfato de hidrazina (0,15 g/1000 ml)– num balão volumétrico de 1000 ml dissolveu-se cerca de 0,150 g de sulfato de hidrazina ($\text{N}_2\text{H}_4\text{-H}_2\text{SO}_4$) em água destilada até completar o volume.

Técnica de Ensaio

• Soluções-padrão e Calibração

- Numa série de 7 balões volumétricos de 50 ml introduziram-se, respetivamente, 0,0, 1,0, 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 e 10,0 ml da solução padrão de fósforo.
- Seguiu-se a adição de volume de água destilada suficiente para perfazer 10 ml de líquido em todos os balões.
- Acrescentou-se 8 ml de solução de sulfato de hidrazina e 2 ml de solução de molibdato de sódio.
- Após agitação, o balão foi aquecido em banho-maria durante 10 minutos, em franca ebulição.
- Seguiu-se o arrefecimento em banho de água, e completou-se o volume com água destilada.
- Procedeu-se à leitura da absorvência do líquido num espectrofotómetro, a 650 nm, utilizando água destilada como meio de referência.
- Traçou-se uma curva de calibração tendo em abcissas as concentrações de fósforo das 7 soluções-padrão e em ordenadas as correspondentes absorvências.

• Amostras

- Pesou-se cerca de 2 g de óleo em cadinhos de platina, em duplicado. Fez-se simultaneamente um ensaio em branco.
- Adicionou-se 0,5 g de óxido de zinco em todos os cadinhos.
- Os cadinhos foram aquecidos num bico de Bunsen até a chama desaparecer e se verificar uma cor avermelhada no fundo dos mesmos.
- A amostra foi calcinada numa mufla durante uma hora a 57,5°C.
- Deixou-se arrefecer num exsiccador, posto o qual adicionou-se 5 ml de água e 5 ml de ácido clorídrico concentrado, medidos por proveta.
- Tapou-se os cadinhos com um vidro de relógio e aqueceu-se, mantendo o conteúdo em ebulição moderada durante 5 minutos.
- O líquido resultante foi filtrado para um balão de 100 ml, lavando-se o cadinho, o vidro de relógio e o filtro 5 vezes, com 5 ml de água destilada quente de cada vez.

- h) Deixou-se arrefecer e neutralizou-se, gota a gota, com a solução de hidróxido de sódio, até ligeira turvação.
- i) Adicionou-se ácido clorídrico concentrado até que o precipitado entretanto formado se dissolvesse por completo.
- j) Diluiu-se a solução em água destilada, completando o volume do balão de 100 ml e homogeneizou-se.
- k) Com o auxílio de uma pipeta de precisão, mediu-se 10 ml da solução obtida para um balão volumétrico de 50 ml.
- l) A partir deste ponto o procedimento é equivalente ao descrito na secção anterior, “Soluções-padrão e Calibração”, a partir da alínea “c)” até à alínea “f)”.

Cálculo do Teor de Fósforo

O teor de fósforo, expresso em percentagem, foi calculado de acordo com a equação (2.9):

$$P (\%) = \frac{10 \times (c_1 - c_2)}{V \times m} \quad 2.9$$

onde:

m – massa, em gramas, da amostra de óleo

c₁ – a concentração, em miligramas de fósforo por 50 mililitros, correspondente segundo a curva de calibração à absorvência lida nos ensaios com amostra.

c₂ – a concentração, em miligramas de fósforo por 50 mililitros, correspondente segundo a curva de calibração à absorvência lida nos ensaios em branco.

V – volume, em mililitros, do líquido medido nas determinações para balão volumétrico de 50 ml (o valor será igual a 10 ml ou inferior).

O resultado pode ser expresso em miligramas de fósforo por quilograma de amostra, multiplicando o valor percentual obtido por 10 000.

2.6.5. Estabilidade à Oxidação

A estabilidade à oxidação (EO) de um óleo ou biodiesel é outro dos parâmetros que, devido à sua importância, está regulamentado pela norma EN 14214, por ser fulcral determinar a sua estabilidade e a suscetibilidade à formação de compostos de elevado peso molecular, produtos da oxidação.

A EO é determinada mediante a avaliação do período de indução num ensaio de oxidação acelerada a 110°C. O período de indução é o número de horas que decorre entre o início da medição e o momento em que se começam a formar produtos da oxidação.

Recorreu-se a um aparelho Rancimat para a avaliação deste parâmetro, sendo que as amostras de óleo sujeitas à reação correspondiam a cerca de 3 gramas.

A norma EN 14214 indica um limite mínimo para o período de indução correspondente a 6 horas.

2.6.6. Teor de Água

O teor de água de um biodiesel é determinado pela norma EN ISO 12937, mediante uma reação de Karl Fischer coulométrico. Corresponde à quantidade de água, expressa em partes por milhão, presente numa amostra de biodiesel.

A amostra é injetada num aparelho de titulação de um aparelho “Karl-Fischer”, sujeita a agitação. O iodo necessário à reação de Karl-Fischer é gerado coulometricamente no ânodo. Após titulação de toda a água presente na amostra, a libertação de iodo em excesso é detetada terminando a titulação. A quantidade total de água será proporcional à corrente total integrada, pela lei de Faraday, tendo em conta que uma mole de iodo reagirá com uma mole de água.

A norma EN 14214 estabelece como teto máximo de água num biodiesel o valor de 500 ppm.

Para determinação deste parâmetro efetuou-se o seguinte procedimento laboratorial:

Técnica de Ensaio

- a) Com o auxílio de uma seringa, retirou-se uma amostra de biodiesel (ação realizada em triplicado).
- b) Pesou-se a seringa e o seu conteúdo com precisão à décima de miligrama, tarando-se de seguida.
- c) Inseriu-se a agulha no recipiente do aparelho destinado à titulação, com a ponta um pouco abaixo da superfície do líquido. Após pressionar “start”, injetou-se a amostra a analisar.
- d) Retirou-se a seringa, tendo a mesma sido pesada.
- e) Obteve-se um valor absoluto que corresponde à quantidade de amostra injetada. Este valor foi inserido no sistema do titulador com auxílio do teclado, carregando em “enter” no final.
- f) Quando foi detetado o ponto final da titulação, anotou-se o valor afixado no ecrã do titulador, expresso em ppm, indicativo da quantidade de água presente na amostra.

2.6.7. Ponto de Inflamação

O ponto de inflamação num biodiesel é determinado segundo a norma EN ISO 3679. O método consiste na colocação de uma amostra, de volume definido, num reator a uma temperatura previamente estimada. Após um intervalo de tempo determinado, aplica-se uma chama e observa-se a ocorrência ou não de ignição. São realizados vários testes a diferentes

temperaturas até determinar o ponto de inflamação. A temperatura mínima de inflamação aceitável para um biodiesel, de acordo com a EN 14214:2008, é de 101°C.

Utilizou-se, para determinação do ponto de inflamação, um aparelho "Petrotest 30000".

2.7. Métodos cromatográficos de caracterização do óleo e do biodiesel

2.7.1. Composição do óleo em termos de ácidos gordos

A avaliação qualitativa e quantitativa da composição em termos de ácidos gordos de uma amostra de óleo é obtida por análise cromatográfica após derivatização da amostra pelo método do trifluoreto de boro. A metodologia seguida foi a norma europeia EN ISO 5509, consistindo na saponificação dos glicéridos com hidróxido de sódio em metanol, seguida da conversão dos sabões em ésteres metílicos por reação com uma solução metanólica de trifluoreto de boro.

Passa-se a descrever o procedimento laboratorial realizado:

Técnica de Ensaio

- a) Preparou-se um banho termostatzado, para que o mesmo estabilizasse nos 85°C pretendidos.
- b) Pesou-se, em balões de destilação de 50 ml, cerca de 150 miligramas de amostra.
- c) Adicionou-se 4 ml de solução metanólica de hidróxido de sódio (0,5 M), além de reguladores de ebulição.
- d) Montou-se a coluna de destilação com os tubos de refluxo.
- e) Adaptou-se o balão ao condensador, colocando-o no banho termostatzado.
- f) Após 10 minutos em ebulição (pelo menos até desaparecerem as gotas de matéria gorda), nos quais se procedia a uma ligeira agitação de minuto a minuto, visando impedir a formação de um anel de hidróxido de sódio à volta do balão adicionou-se 5 ml de solução metanólica de trifluoreto de boro (15%).
- g) A solução permaneceu em ebulição por 3 minutos adicionais.
- h) Acrescentou-se 3 ml de iso-octano.
- i) Retirou-se de seguida o balão do banho termostatzado, mantendo-o ligado à coluna de destilação, juntando 10 ml de uma solução saturada de NaCl em água destilada. Separou-se, então, o balão da coluna, adicionando mais 10 ml da solução de NaCl.
- j) Tapou-se o balão e agitou-se fortemente durante 15 segundos.
- k) Colocou-se o nível de líquido no balão junto ao pescoço, juntando mais solução de cloreto de sódio.
- l) Após a separação de fases, retirou-se, com o auxílio de uma pipeta, o sobrenadante - composto por iso-octano e ésteres metílicos -, passando-o por sulfato de sódio anidro com o intuito de eliminar traços de água, obtendo-se a amostra final.

Caso se pretenda, unicamente, avaliar a composição da amostra derivatizada em função da percentagem relativa de cada um dos ésteres de ácido gordo, a amostra obtida após a alínea l) pode ser imediatamente submetida a análise cromatográfica. Todavia, pretendendo-se determinar o teor absoluto em ácidos gordos na amostra de óleo derivatizada, torna-se necessário realizar os seguintes procedimentos suplementares:

- m) Pesou-se cerca de 15 mg de padrão interno (heptadecanoato de metilo) para um tubo de vidro rolhado, juntando posteriormente 1,5 ml da amostra derivatizada.
- n) Homogeneizou-se a amostra com recurso a um “vortex”, ficando preparada para posterior análise por cromatografia.

Análise cromatográfica

A análise das amostras de óleo foi, após preparação das mesmas, realizada num cromatógrafo (Varian 3800) de fase gasosa equipado com detetor de ionização à chama e coluna capilar (Supelcowax 10; comprimento – 30 m; diâmetro interno – 0,32 mm; espessura do filme – 0,25 µm) nas seguintes condições:

- Temperatura inicial da coluna – 200°C (durante 20 min)
- Taxa de aquecimento da coluna – 20°C/min
- Temperatura final da coluna – 220°C (durante 20 min)
- Temperatura do injetor – 250°C
- Temperatura do detetor – 250°C

O cromatógrafo tinha já introduzido um método para a identificação dos ésteres metílicos de ácidos gordos, de acordo com os tempos de retenção de cada pico a identificar (quadro 2.2.):

Quadro 2.2. Picos referenciados nos cromatogramas e respetivos tempos de retenção.

Tempo de Retenção (minutos)	Nome do Pico
3,700	C14:0
4,410	C16:0
4,600	C16:1
4,900	PI (padrão interno)
5,780	C18:0
5,900	C18:1
6,300	C18:2
7,170	C18:3
8,000	C20:0
8,400	C20:1
12,500	C22:0
21,400	C24:0

Nos cromatogramas, a área correspondente a cada cadeia de ácido gordo, os tempos de retenção e a área total são pontos de foco.

A composição da amostra de óleo derivatizada, em termos de percentagem mássica de cada um dos ésteres metílicos é dada pela equação (2.10):

$$\text{Éster (\% m/m)} = \frac{A_i}{(\sum A) - A_{EI}} \times 100 \quad 2.10$$

onde

$\sum A$ – área total dos picos dos ésteres metílicos de C14:0 a C24:0

A_{EI} – área do pico correspondente ao padrão interno

A_i – área do pico “i”

Nos óleos, o teor absoluto de ácidos gordos na amostra derivatizada, expresso em fração mássica percentual, é dada pela equação (2.11):

$$\text{Ésteres (\% m/m)} = \frac{(\sum A) - A_{EI}}{A_{EI}} \times \frac{m_{EI}}{\frac{m}{2}} \times 100 \quad 2.11$$

sendo

$\sum A$ – área total dos picos dos ésteres metílicos de C14:0 a C24:0

A_{EI} – área do pico correspondente ao padrão interno

m_{EI} – quantidade de padrão interno pesado (mg)

m – massa da toma de amostra de óleo ou gordura derivatizada (mg)

2.7.2. Teor de ésteres metílicos totais e de éster metílico do ácido linolénico.

O teor de ésteres metílicos numa amostra de biodiesel é determinado por cromatografia gasosa segundo a norma EN 14103. Este parâmetro corresponde à quantidade total, expressa em percentagem de peso, dos vários compostos de ésteres metílicos derivados de ácidos gordos, com cadeias entre C14:0 e C24:0, presentes na amostra.

A norma EN 14214 estipula que o limite mínimo de ésteres metílicos presente na amostra é de 96,5% (m/m), e o do éster metílico do ácido linolénico é de 12% (m/m).

Técnica de Ensaio

- Pesou-se cerca de 30 mg de padrão interno em tubos de vidro rolhados (em duplicado)
- Juntou-se cerca de 150 mg de amostra de biodiesel.
- Adicionou-se 3 ml de heptano.
- Homogeneizou-se num “vortex” e injetou-se cerca de 1 µl num cromatógrafo, tendo a análise sido efetuada nas condições descritas na secção 2.7.1.

No biodiesel, o teor total de ésteres metílicos, em percentagem, é dado pela equação (2.12):

$$\text{Ésteres (\% m/m)} = \frac{(\sum A) - A_{EI}}{A_{EI}} \times \frac{C_{EI} \times V_{EI}}{m} \times 100 \quad 2.12$$

onde

$\sum A$ – área total dos picos dos ésteres metílicos de C14:0 a C24:0

A_{EI} – área do pico correspondente ao padrão interno

C_{EI} – concentração da solução de padrão interno (mg/ml)

V_{EI} – volume da solução de padrão interno (ml)

m – massa da toma de amostra de biodiesel (mg)

O teor de éster metílico do ácido linolénico, relativo ao total de ésteres metílicos presentes na amostra, é dado pela equação (2.13):

$$\text{Éster metílico do C18:3 (\% m/m)} = \frac{A_L}{(\sum A) - A_{EI}} \times 100 \quad 2.13$$

sendo

$\sum A$ – área total dos picos dos ésteres metílicos de C14:0 a C24:1

A_{EI} – área do pico correspondente ao padrão interno

A_L – área do pico correspondente ao éster metílico do ácido linolénico

2.7.3. Teores de glicerol livre e total, e de mono, di e triglicéridos no biodiesel

Os teores máximos de glicerol livre, glicéridos (mono, di e tri) e glicerol total no biodiesel são fixados pela norma EN 14214. Os mono, di e triglicéridos não devem estar presentes numa percentagem superior a 0,8, 0,2 e 0,2% (m/m), respetivamente; o glicerol livre não deve ser superior a 0,02% (m/m) e o glicerol total a 0,25% (m/m).

A presença dos compostos acima referidos em elevada percentagem pode ser indicativa de uma transesterificação incompleta, com baixo rendimento em ésteres metílicos.

Por intermédio do procedimento descrito na norma europeia EN 14105, foram determinados os teores de glicerol e glicéridos recorrendo à cromatografia gasosa. Os glicéridos e o glicerol foram previamente transformados em derivados silanizados mais voláteis, na presença de piridina e MSTFA (N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida).

Técnica de Ensaio

- Pesou-se 100 g de amostra de biodiesel para tubos de vidro rolhados (em duplicado)
- Adicionou-se 80 μ l de uma solução de 1,2,4-butanotriol (1 mg/ml), preparada em piridina. Esta solução é o padrão interno para a determinação do glicerol.

- c) Juntou-se 100 µl de solução de tricaprina (8 mg/ml), em piridina – o padrão interno para a determinação dos glicéridos.
- d) Acrescentou-se 100 µl de MSTFA, o agente derivatizante.
- e) Homogeneizou-se num “vortex”, ficando a solução em repouso durante 15 minutos
- f) Adicionou-se 8 ml de heptano, homogeneizou-se e a solução ficou pronta para a análise cromatográfica.

Análise cromatográfica

Para a correta determinação dos parâmetros atrás referidos, é necessária a calibração prévia com uma mistura de referência contendo glicerol, monooleína, dioleína e trioleína. Nas retas de calibração fez-se corresponder ao eixo das ordenadas a massa, em mg, de dado composto, representando o eixo das abcissas o produto da área do mesmo composto pela concentração do padrão interno correspondente, dividido pela área do mesmo padrão.

Na análise da amostra de biodiesel obteve-se, após a injeção de 1 µl de amostra, os picos esperados no cromatograma e as respectivas áreas. Para a determinação da percentagem total em monoglicéridos, somou-se as áreas obtidas para a monopalmitina, mono-oleína e monoestearina. No caso dos diglicéridos, somou-se a área da dioleína à área do pico imediatamente anterior. A área da trioleína correspondeu à área total dos triglicéridos.

Determinou-se o valor das abcissas, de acordo com a expressão atrás descrita e, com o auxílio da equação da reta, determinou-se o valor da massa, em mg, de cada um dos glicéridos e do glicerol livre (ordenada) na amostra de biodiesel.

Seguiu-se a determinação da quantidade de cada composto por unidade de biodiesel, expressa em percentagem (m/m):

Glicerol livre:

$$GL (\% m/m) = \frac{\bar{M}_{gl}}{m} \times 100 \quad 2.14$$

onde

\bar{M}_{gl} – valor médio da massa de glicerol numa amostra de biodiesel (mg)

m – massa da toma de amostra de biodiesel (mg)

Monoglicéridos:

$$MG (\% m/m) = \frac{\bar{M}_g}{m} \times 100 \quad 2.15$$

onde

\bar{M}_g – valor médio da massa de monoglicéridos numa amostra de biodiesel (mg)

m – massa da amostra de biodiesel (mg)

Di e triglicéridos:

forma de cálculo idêntica à dos monoglicéridos

Glicerol total:

o teor de glicerol total foi determinado pela soma ponderada dos valores de glicerol livre e glicéridos obtidos nos cálculos anteriores, de acordo com a equação (2.16):

$$GT (\%m/m) = GL + (0,255 \times MG) + (0,146 \times DG) + (0,103 \times TG) \quad 2.16$$

sendo:

GL – teor de glicerol livre (% m/m)

MG – teor de monoglicéridos (% m/m)

DG – teor de diglicéridos (% m/m)

TG – teor de triglicéridos (% m/m)

A análise cromatográfica das amostras de calibração e de biodiesel foram realizadas num cromatógrafo (Varian 3800) equipado com detetor de ionização à chama e coluna capilar (SPB™-1 TG, comprimento – 15 m; diâmetro interno – 0,53 mm; espessura do filme – 0,10 µm), nas seguintes condições:

- Temperatura inicial da coluna – 50°C (durante 1 min)
- Taxa de aquecimento da coluna – 15°C/min
- Temperatura da coluna – 180°C
- Taxa de aquecimento da coluna – 7°C/min
- Temperatura da coluna – 230°C (durante 1 min)
- Taxa de aquecimento da coluna – 10°C/min
- Temperatura da coluna – 320°C (durante 10 min)
- Temperatura do injetor – 300°C
- Temperatura do detetor – 320°C
- Gás de arraste – Hélio

2.7.4. Teor de metanol

Entende-se por teor de metanol a quantidade deste composto, expressa em percentagem de peso, presente no biodiesel.

O teor em metanol de uma amostra de biodiesel é determinado por cromatografia gasosa após volatilização, segundo a norma europeia NF EN 14110. O método especificado nesta norma permite a determinação de teores de metanol, numa gama de concentrações entre 0,01% e 0,5% (m/m), em amostras de ésteres metílicos de ácidos gordos para utilização como biodiesel ou em aquecimento doméstico. Este método não é aplicável a amostra contendo outros compostos voláteis.

A amostra é aquecida a 80°C num *vial* hermeticamente selado para permitir a passagem do metanol para a fase gasosa. Quando se atinge o equilíbrio, uma parte definida dessa fase gasosa é injetada num cromatógrafo gasoso onde o metanol é detetado com um detetor de ionização à chama. O metanol é, normalmente, o único pico no cromatograma e o seu teor avaliado face a uma calibração interna, sendo o padrão adicionado à amostra antes do seu aquecimento.

Reagentes

- a) Metanol com grau de pureza superior a 99,5%
- b) 2-propanol com grau de pureza superior a 99,5% (padrão interno)
- c) Mistura de referência de ésteres metílicos de ácidos gordos com um teor em metanol inferior a 0,001% (m/m) – esta mistura pode ser obtida comercialmente ou lavando 3 a 5 vezes com água numa ampola de separação e secando a 90°C, sob agitação e pressão reduzida.
- d) N-heptano.

Técnica de Ensaio

- a) Pesou-se em triplicado, para *headspace vials*, tomas de amostra de 5 g.
- b) Adicionou-se, pesando, 5 µl (~3,95 mg) de 2-propanol diretamente sobre o líquido usando uma micropipeta.
- c) Selou-se imediatamente o *vial* e agitou-se fortemente para permitir uma boa mistura.
- d) A cada intervalo de 20 minutos introduziu-se um *vial* na estufa termostatzada a 80°C, mantendo-o aí durante exatamente 45 minutos
- e) Pré-aqueceu-se ligeiramente a seringa de injeção, colocando-a, por exemplo, no cromatógrafo por baixo da tampa junto ao injetor.
- f) Procedeu-se à amostragem de fase gasosa no *vial*, inserindo a seringa no *septum* respetivo.
- g) Seguidamente abriu-se a seringa carregando no botão verde em direção ao corpo da mesma, retirou-se 200 µl de fase gasosa e fechou-se a seringa carregando desta vez no botão vermelho.
- h) Injetou-se a amostra no cromatógrafo, após inserção da seringa no detetor seguida de abertura da mesma.
- i) Carregou-se em “Start” no cromatógrafo. Este procedimento fez correr um programa com rampa de aquecimento até 150°C para limpar a coluna após 4 minutos a 110°C, tempo suficiente para eluir a amostra.
- j) Após injeção, a seringa foi lavada com n-heptano e seca com ar comprimido antes da injeção seguinte, podendo ainda deixar-se as peças separadas (corpo e êmbolo) durante o aquecimento prévio em cima do cromatógrafo.

Antes da execução dos passos acima, foi necessária a calibração do cromatógrafo com soluções de metanol contendo um padrão interno (2-propanol) e submetidas ao mesmo procedimento que as amostras antes da análise cromatográfica.

O cromatógrafo gasoso (HP 5890) equipado com detetor de ionização à chama e coluna de enchimento (Carbopack 80-120 BDA, 1% tremisil acid + 4% CW 20M; 2 m x 1/8") foi ligado e regulado para as seguintes condições de trabalho:

- Temperatura da coluna – 110°C
- Temperatura do injetor – 150°C
- Temperatura do detetor – 200°C

Cálculo dos resultados

O teor em metanol numa amostra de biodiesel (C_m), expresso em % (m/m) foi calculado, até às décimas, de acordo com a equação (2.17):

$$C_m = \frac{F \times S_m \times C_i}{S_i} \quad 2.17$$

onde:

F – fator de calibração

S_m - valor da área do pico do metanol

C_i – teor em 2-propanol adicionado à amostra, expresso em % (m/m). (5 µl = 0,0785% (p/p))

S_i – valor da área do pico do 2-propanol

A norma europeia EN 14214 estipula o valor de 0,2% (m/m) como o valor máximo admissível para um biodiesel de qualidade

2.8. Métodos de caracterização das preparações enzimáticas

Para a realização dos ensaios de transesterificação enzimática realizados, foi necessário determinar a concentração proteica das enzimas utilizadas. As lipases imobilizadas Lipozyme TL IM (sn-1,3-*specific*) e Novozym 435 (não específica), e a lipase solúvel Lipozyme 100L (sn-1,3-*specific*) foram as enzimas cuja concentração proteica foi determinada, o que permitiu saber quais as quantidades reais de enzima a utilizar em cada ensaio, excluindo a massa do suporte inorgânico.

Sendo as enzimas proteínas, o método utilizado para avaliar o teor proteico foi a metodologia de Lowry, a qual é utilizada na determinação do teor proteico de muitas substâncias.

Este método consiste na reação do grupo fenólico da tirosina e do triptofano (aminoácidos) com o reagente de Folin-Ciocalteu, que contém tungstato-molibdato de sódio e fosfato, e donde resulta uma tonalidade azul, devido a tratamento das amostras proteicas. Sendo assim,

a intensidade do azul dependerá da quantidade desses aminoácidos aromáticos presentes, variando de proteína para proteína (Owusu-Apenten, 2002).

O teor proteico é determinado colorimetricamente, a 750 nm, por comparação com uma reta de calibração obtida com solução padrão de albumina de soro bovino (BSA), geralmente utilizada pelo seu baixo custo e elevada pureza.

2.8.1. Doseamento da Proteína Imobilizada

O procedimento para determinação da proteína no caso das enzimas imobilizadas foi o seguinte.

Reagentes

- a) Solução aquosa de hidróxido de sódio (1 N) – dissolveu-se 2 g de NaOH em 50 ml de água destilada.
- b) Solução aquosa de carbonato de sódio (5%) – dissolveu-se 5 g de NaCO₃ em 100 ml de água
- c) Solução aquosa de tartarato duplo de sódio e potássio (2%) – dissolveu-se 0,2 g de tartarato em 10 ml de água
- d) Solução aquosa de sulfato de cobre (1%) – dissolveu-se 0,1 g de sulfato de cobre em 10 ml de água
- e) Reagente de Folin-Ciocalteu diluído em água na proporção 1:2

Técnica de Ensaio

- a) Secou-se a enzima imobilizada, numa caixa de Petri, durante 3 horas, a 100°C, numa estufa.
- b) Após a secagem, retirou-se a amostra, colocando-a no exsiccador.
- c) Pesou-se aproximadamente 25 mg de amostra, em duplicado, adicionou-se 5 ml de água destilada e 5 ml da solução de NaOH. Agitou-se bem e colocou-se a solução a ferver durante 5 minutos, realizando-se assim a hidrólise proteica.
- d) Arrefeceu-se a amostra e retirou-se, de seguida, 1,5 ml da solução obtida (enzima hidrolisada), que foi submetida a centrifugação.
- e) Retirou-se 1 ml (sobrenadante) da solução enzimática hidrolisada, já centrifugada, adicionando 5 ml de uma solução preparada com 50 ml da solução de carbonato de sódio, 1 ml da de tartarato e 1 ml da de sulfato de cobre. Agitou-se bem e aguardou-se 10 minutos, findos os quais se juntou 1 ml da solução do reagente de Folin-Ciocalteu diluído, agitando novamente.
- f) Aguardou-se 30 minutos e fez-se a leitura ótica de absorvência, no espectrofotómetro, a 750 nm.

Foi realizado em paralelo um ensaio em branco, usando-se 1 ml de água destilada ao invés de solução enzimática.

O teor de proteína imobilizada foi determinado de acordo com a equação (2.18):

$$\text{Teor proteico (mg/mg suporte)} = \text{proteína (mg)} / \text{peso da amostra (mg)} \quad 2.18$$

Na expressão acima, “proteína mg” corresponde à quantidade de proteína pura, sendo esta obtida a partir da reta de calibração (obtida como descrito em 2.8.2.).

2.8.2. Doseamento da Proteína Solúvel

Para determinação da quantidade de proteína presente na enzima solúvel seguiu-se o procedimento abaixo, válido também para as soluções de albumina de soro bovino utilizadas para a reta de calibração.

Reagentes

- a) Solução aquosa de hidróxido de sódio (1 N) – ver 2.8.1.
- b) Solução aquosa de carbonato de sódio (2%) – dissolveu-se 2 g de NaCO_3 em 100 ml de água
- c) Solução aquosa de tartarato duplo de sódio e potássio (2%) – ver 2.8.1.
- d) Solução aquosa de sulfato de cobre (1%) – ver 2.8.1.
- e) Reagente de Folin-Ciocalteu diluído em água na proporção 1:2

Técnica de Ensaio

- a) Em 2 balões volumétricos, um de 100 e outro de 200 ml, colocou-se 1 ml da solução aquosa da enzima solúvel, e perfiz-se com água destilada.
- b) Retirou-se 0,5 ml da solução enzimática diluída e adicionou-se 0,5 ml de NaOH, agitando-se de seguida e aguardando depois 30 minutos.
- c) Findos os 30 minutos, adicionou-se 5 ml de uma solução constituída por 50 ml de carbonato de sódio, 0,5 ml de tartarato e 0,5 ml de sulfato de cobre. Agitou-se bem e aguardou-se durante mais 10 minutos.
- d) Adicionou-se 0,5 ml de reagente de Folin-Ciocalteu diluído, agitou-se e aguardou-se 30 minutos antes de se efetuar a leitura da absorvância a 750 nm.

Foi realizado em paralelo um ensaio em branco, usando 0,5 ml de água destilada ao invés de solução enzimática.

Com base na leitura da absorvância determinou-se a concentração enzimática usando a reta de calibração, com recurso a uma solução-padrão de albumina de soro bovino.

Reta de Calibração

A partir de uma solução de albumina de concentração conhecida (240 µg/ml), efetuaram-se diferentes diluições, obtendo-se soluções com concentrações de BSA variando entre 30 e 240 µg/ml, que foram sujeitas a tratamento idêntico ao descrito acima para a enzima solúvel. Após leitura da densidade ótica, traçou-se uma reta de calibração que foi utilizada para calcular a concentração proteica das diferentes enzimas.

2.9. Método de imobilização da enzima solúvel

Para além da determinação da concentração enzimática das enzimas referidas anteriormente, para que se procedesse à transesterificação enzimática, efetuou-se a imobilização da enzima solúvel Lipozyme 100L por adsorção num suporte inorgânico de poliamida (EP 700).

Técnica de Ensaio

- a) Juntou-se, num tubo de vidro rolhado, 2,8 ml de solução enzimática a 750 mg de suporte de poliamida.

O valor 2,8 ml advém da quantidade de enzima solúvel Lipozyme 100L, usada noutros ensaios, que conteria a mesma quantidade de proteína que 750 mg da mesma enzima imobilizada, a Lipozyme TL IM. Esse valor foi calculado após determinação da concentração enzimática por recurso à reta de calibração.

- b) Noutro tubo, adicionou-se 4,0 ml de solução enzimática a 750 mg de suporte.

Aqui adicionou-se uma quantidade, teoricamente, excessiva de solução enzimática para que se pudesse aferir os limites de adsorção no caso em estudo.

- c) Agitaram-se os 2 tubos em “vórtex” durante 1 minuto, ficando ambos em repouso, a seguir, durante uma hora à temperatura ambiente.
- d) Lavaram-se as soluções duas vezes com água destilada, de modo a remover a enzima não adsorvida, e filtrou-se sob vácuo.
- e) Determinou-se a concentração enzimática no suporte pela metodologia de Lowry, descrita na secção 2.8.1.

2.10. Métodos de produção de biodiesel a partir do óleo de *Jatropha curcas*

As reações de transesterificação permitiram aquilo que era, afinal, o objetivo do trabalho: a produção de biodiesel a partir do óleo de purgueira. Foram realizadas transesterificações por via básica, sob condições otimizadas e correntes na produção em massa de biodiesel a partir de diferentes óleos. Esta catálise foi empregue meramente para aferir da sua validade com esta variedade específica de *Jatropha curcas*. Posteriormente, foram efetuados ensaios de transesterificação enzimática, processo a que foi dado maior ênfase, procedendo-se à otimização do processo e caracterização do biodiesel produzido.

2.10.1. Transesterificação via catálise básica

Procedeu-se à transesterificação química por catálise básica de 3 diferentes formas: a primeira precedida de neutralização, a segunda precedida de catálise ácida, com hidróxido de sódio a ser adicionado na catálise básica em quantidade suficiente para neutralizar o óleo, e na terceira houve somente adição de NaOH suficiente para ocorrer a neutralização na catálise básica. Em todos os casos, os óleos foram submetidos a degomagem com água antes de serem sujeitos a qualquer outro tratamento.

As condições de ensaio para a catálise básica foram comuns, tendo sido o hidróxido de sódio usado como catalisador (1% de massa de NaOH utilizado em relação à massa de óleo) e o metanol como álcool reacional (6:1 de razão molar metanol:óleo).

Pesou-se as quantidades adequadas de metanol e hidróxido de sódio, num frasco *erlenmeyer*, esperando-se que o último se dissolvesse por completo, o que foi acelerado pelo uso de uma placa de agitação, a 50°C e com agitação constante. A solução de metóxido de sódio formada foi adicionada ao óleo, previamente pesado. A mistura obtida foi posta a reagir a 55°C, durante 3 horas, com agitação a 200 rpm, numa incubadora.

- a) **Catálise básica precedida de neutralização** – pesou-se 40 g de óleo e procedeu-se a degomagem com água. Neutralizou-se com NaOH 3M e avaliou-se o índice de acidez. Procedeu-se à catálise básica.
- b) **Catálise básica precedida de catálise ácida, com adição de NaOH para neutralização** – pesou-se 40 g de óleo e procedeu-se a degomagem com água. Procedeu-se à catálise ácida sob condições otimizadas em trabalhos anteriores (Simas, 2008), realizados na Unidade de Bioenergia do LNEG, usando ácido sulfúrico concentrado (20 % em relação à percentagem de ácidos gordos livres, que corresponde ao valor obtido no cálculo da acidez em função do ácido oleico – ver 2.6.1.) e metanol como álcool reacional (razão molar de 30:1 em relação aos AGL). A reação decorreu durante 75 minutos, a 60°C e 160 rpm. Findo este tempo, separou-se as

fases via centrifugação e, após a avaliação do índice de acidez, procedeu-se à catálise básica nas condições definidas, adicionando quantidade suficiente de NaOH para que, simultaneamente, os AGL presentes no óleo fossem neutralizados. Esta quantidade de NaOH foi determinada a partir do valor do índice de acidez, partindo-se do princípio que para um número de moles por grama de KOH necessário para neutralizar os ácidos gordos no cálculo do índice de acidez corresponde o mesmo número de moles de NaOH neste método de neutralização.

- c) **Catálise básica com adição de NaOH para neutralização** – pesou-se 20 g de óleo, procedeu-se à degomagem com água e realizou-se a catálise básica segundo as condições definidas, adicionando, com base no valor de índice de acidez, uma quantidade de NaOH suficiente para neutralizar os AGL presentes no óleo.

Separação de fases e purificação do biodiesel

Após as reações de transesterificação procedeu-se à centrifugação das amostras para separação da fase onde se encontravam ésteres metílicos da aquosa, composta por glicerol, metanol e água. A centrifugação decorreu durante 5 minutos, a 8000 rpm e 20°C. Retirou-se o sobrenadante (metil-ésteres) e, após pesagem, efetuou-se a lavagem do biodiesel: adicionou-se ao biodiesel 20 ml de água por quilograma de óleo utilizado na reação de transesterificação. Esta mistura permaneceu sob agitação durante 10 minutos, a 55°C, numa placa de aquecimento. Após nova centrifugação, repetiu-se o processo de lavagem.

Os resíduos de água ou metanol foram, posteriormente eliminados num evaporador rotativo a 40°C, a uma pressão de 120 mbar, durante 30 a 60 minutos. Posto isto, e caso ainda se notasse a presença de água, esta foi eliminada fazendo passar o óleo por sulfato de sódio anidro, presente numa pipeta Pasteur, contendo algodão.

2.10.2. Transesterificação Enzimática

As reações de transesterificação enzimática do óleo de *Jatropha curcas* foram realizadas com diferentes enzimas, já mencionadas aquando da descrição do método de determinação da concentração proteica: Lipozyme TL IM, Novozym 435 e Lipozyme 100L. Acresce a utilização da enzima solúvel Lipozyme 100L imobilizada num suporte de poliamida.

No grosso dos ensaios utilizou-se a enzima Lipozyme TL IM, que tinha demonstrado melhor desempenho em trabalhos anteriores com diferentes óleos. Após a determinação das condições reacionais ótimas, efetuaram-se ensaios com as outras enzimas para fins comparativos.

2.10.2.1. Otimização do processo de transesterificação enzimática do óleo de *Jatropha curcas*

A metodologia da superfície de resposta foi a escolhida para a otimização do processo de produção de biodiesel. Esta permite o estudo de sistemas influenciados por vários parâmetros, reduzindo o número de ensaios cuja realização é necessária. A temperatura, a razão molar metanol/óleo, a quantidade de lipase e a percentagem de água foram os 4 parâmetros cujo impacto na percentagem total de ésteres metílicos obtidos foi avaliado. Construiu-se um desenho composto central, onde pontuavam um desenho fatorial de 4 variáveis a 2 níveis simétricos (-1/+1) e com a expansão aos pontos estrela (-2/+2). Foi necessária a realização de um ponto médio (0) em triplicado. Assim sendo, aos 4 parâmetros em estudo foram atribuídos valores no intervalo [-2, -1, 0, +1, +2] (quadro 2.3.). Esses valores derivaram de conhecimento prévio do sistema, como por exemplo, o intervalo mais comum de temperaturas que propiciam a atividade das enzimas ou o efeito da razão molar e da água em trabalhos anteriores. A quantidade de lipase foi definida, inicialmente, como variando de 5 a 15% em função da massa de óleo. Esse peso correspondia ao suporte e não à massa pura de lipase, que foi determinada pela metodologia de Lowry.

Quadro 2.3. Parâmetros estudados na otimização do processo de produção de biodiesel e valores definidos no intervalo.

Parâmetro	Níveis				
	-2	-1	0	+1	+2
T - Temperatura (°C)	20	27,5	35	42,5	50
M - Razão molar metanol:óleo	3:1	6:1	9:1	12:1	15:1
L – Quantidade de lipase (mg)	48,4	72,6	96,8	121,0	145,2
A – Quantidade de água (% m/m em função do óleo)	0	6	12	18	24

No desenho composto central as condições do ensaio a determinar foram definidas conforme preenchimento das colunas da matriz seguindo algumas diretrizes: a primeira coluna consistia de sinais negativos e positivos sucessivos (correspondentes aos limites -1/+1 do desenho fatorial), a segunda de pares sucessivos de sinais negativos e positivos, a terceira de 4 sinais negativos seguidos de 4 sinais positivos sucessivos e a quarta de 8 sinais negativos seguidos de 8 sinais positivos (quadro 2.4). Na expansão aos pontos estrela (-2/-2), a primeira coluna consistia num sinal negativo seguido de um sinal positivo, estando as restantes linhas preenchidas com o 0; na segunda coluna os sinais negativo e positivo encontravam-se nas 3ª e 4ª linha; na terceira coluna os sinais negativo e positivo encontravam-se nas 5ª e 6ª linha; na quarta coluna os sinais negativo e positivo encontravam-se nas 7ª e 8ª linha; as restantes linhas foram preenchidas com os valores correspondentes aos valores médios dos parâmetros em estudo (quadro 2.4). Além disso, efetuaram-se 3 ensaios correspondentes ao ponto médio (valores “0” dos diferentes parâmetros) (quadro 2.4.).

Quadro 2.4. Ensaios sequenciais para níveis -1/+1, -2/+2 e pontos médios, com os valores definidos para os parâmetros em estudo.

Sequência	Níveis (-1/+1)				Valores a ensaiar			
	T	M	L	A	T (°C)	RM	L (mg)	A (%)
1	-	-	-	-	27,5	6:1	72,6	6
2	+	-	-	-	42,5	6:1	72,6	6
3	-	+	-	-	27,5	12:1	72,6	6
4	+	+	-	-	42,5	12:1	72,6	6
5	-	-	+	-	27,5	6:1	121,0	6
6	+	-	+	-	42,5	6:1	121,0	6
7	-	+	+	-	27,5	12:1	121,0	6
8	+	+	+	-	42,5	12:1	121,0	6
9	-	-	-	+	27,5	6:1	72,6	18
10	+	-	-	+	42,5	6:1	72,6	18
11	-	+	-	+	27,5	12:1	72,6	18
12	+	+	-	+	42,5	12:1	72,6	18
13	-	-	+	+	27,5	6:1	121,0	18
14	+	-	+	+	42,5	6:1	121,0	18
15	-	+	+	+	27,5	12:1	121,0	18
16	+	+	+	+	42,5	12:1	121,0	18

Sequência	Níveis (-2/+2)				Valores a ensaiar			
	T	M	L	A	T (°C)	RM	L (mg)	A (%)
17	-2	0	0	0	20	9:1	96,8	12
18	+2	0	0	0	50	9:1	96,8	12
19	0	-2	0	0	35	3:1	96,8	12
20	0	+2	0	0	35	15:1	96,8	12
21	0	0	-2	0	35	9:1	48,4	12
22	0	0	+2	0	35	9:1	145,2	12
23	0	0	0	-2	35	9:1	96,8	0
24	0	0	0	+2	35	9:1	96,8	24

Sequência					Valores a ensaiar			
	T	M	L	A	T (°C)	RM	L (mg)	A (%)
Ponto Médio (1)	0	0	0	0	35	9:1	96,8	12
Ponto Médio (2)	0	0	0	0	35	9:1	96,8	12
Ponto Médio (3)	0	0	0	0	35	9:1	96,8	12

Os ensaios foram realizados ao acaso, tendo a aleatoriedade sido assegurada pelo uso de uma página na internet onde os números de 1 a 24 eram introduzidos e selecionados (www.random.org). Os ensaios correspondentes ao ponto médio foram realizados em períodos diferentes, intercalando os restantes ensaios definidos no desenho composto central. Alguns ensaios foram repetidos porque, por análise posterior, os resultados da conversão em ésteres metílicos afastavam-se de valores previstos.

Técnica de Ensaio

Utilizou-se 10 g de óleo em cada ensaio. Após adição das quantidades definidas de enzima, água e metanol, procedeu-se à reação de transesterificação numa incubadora durante 18 horas a 150 rpm. No final procedeu-se à separação de fases, lavagem e purificação do biodiesel, conforme o procedimento aquando da catálise básica.

Por análise cromatográfica determinou-se o teor total em ésteres metílicos. Recorreu-se ao programa "STATISTICA 8" para avaliar a influência dos diferentes parâmetros na percentagem de conversão em ésteres e, com recurso aos coeficientes de regressão obtidos, determinar quais seriam os teores de ésteres previstos nos diferentes ensaios. O programa "Mathematica 5", graças a um algoritmo de otimização, permitiu determinar quais seriam as condições ótimas para os ensaios de transesterificação.

3. Resultados e Discussão

3.1. Caracterização das sementes de *Jatropha curcas*

3.1.1. Caracterização do lote obtido em abril de 2010 (primeiro lote)

As sementes provenientes da ilha de Santiago não possuíam casca, ao contrário do que aconteceu com as sementes vindas da ilha do Fogo. Assim sendo, fez-se a determinação do teor de óleo e do teor de água e matérias voláteis nas sementes de Santiago (denominadas “S”), nas sementes do Fogo (denominadas “F”) após descasque no laboratório (F_{SC}) e nas sementes do Fogo com casca (F_{CC}).

Conhecer o valor da percentagem de casca de uma semente é relevante, principalmente no caso da obtenção de óleo a nível industrial. Os 47,8% (m/m) de casca determinados no presente trabalho para as sementes da ilha do Fogo (quadro 3.1.) contrastam com os 35,46% determinados em trabalhos anteriores para sementes da mesma ilha (Heller, 1996). Estes dados sugerem alguma variância dentro do grupo. Relativamente às sementes de Santiago não foi possível determinar a quantidade de casca, encontrando-se na literatura o valor de 44,92% (Heller, 1996). Estima-se que a percentagem de casca, para as diferentes variedades de purgueira, oscile entre os 33,7 e os 45% (Araújo *et al.*, 2007).

A massa em casca pode ser considerada como massa inútil não se considerando formas de aproveitamento para produção de biodiesel, uma vez que contém uma quantidade muito reduzida de óleo (quadro 3.2.). Neste contexto, interessa a uma instalação industrial estar ciente da quantidade de casca, o que, por inerência, permite estabelecer que quantidade de semente deverá ser adquirida para que se obtenha a quantidade desejada de óleo, desde que se conheça o teor de óleo da semente.

Quadro 3.1. Percentagem de casca nas sementes do Fogo.

Amostra	Quantidade de casca (% m/m)
F_{CC}	47,8

Quadro 3.2. Teor de óleo e teor de água e matérias voláteis para as diferentes variedades de *Jatropha curcas*.

Amostra	Teor de água e matérias voláteis % (m/m)	Teor de óleo % (m/m)	Teor de óleo, base seca % (m/m)
S	4,97	53,7	56,5
F_{SC}	4,89	46,6	49,0
F_{CC}	5,86	29,0	30,9
Casca	8,34	3,0	3,3

S – Santiago, sem casca; F_{SC} – Fogo, sem casca; F_{CC} – Fogo, com casca

Em termos do teor de óleo, as diferentes variedades de *Jatropha curcas* poderão ter entre 40 e 60% de óleo na amêndoa (Nazir *et al.*, 2009). No presente trabalho, a variedade santiaguense

revelou ter o maior teor de óleo (quadro 3.2.), o que corrobora os dados referidos por Heller (1996) relativos ao óleo extraído da amêndoa - 59,78% para a variedade de Santiago e 52,83% para a do Fogo. No caso da extração do óleo a partir da semente com casca (F_{CC}), o valor de 30,9% encontra-se no intervalo estipulado por Correia para as sementes cabo-verdianas (30,01 e 39,92%) (Correia, 2009). De notar que todos estes valores dizem respeito ao teor de óleo corrigido do teor de água e matérias voláteis que, para as variedades estudadas no presente trabalho, variou entre 4,89 e 5,86% (quadro 3.2.)

Os óleos extraídos das diferentes variedades de semente de *Jatropha* foram caracterizados em termos de parâmetros relevantes para o processo de produção de biodiesel. Além disso, os óleos foram caracterizados em parâmetros que permitem avaliar a qualidade do biodiesel (quadros 3.3. e 3.4.), que deve cumprir as especificações da norma EN 14214.

Quadro 3.3. Caracterização dos óleos extraídos das diferentes variedades de semente.

Amostra	Índice de Acidez (mgKOH/g)	Índice de Saponificação (mgKOH/g)	Peso Molecular (g/mol)	Índice de Iodo (gI ₂ /100g)	Teor de Fósforo (mg/kg)
S	3,24	194,80	862,40	89,2	94,965
F_{SC}	5,19	192,73	871,67	101,9	181,285
F_{CC}	8,09	n.d.	n.d.	101,2	n.d.

S – Santiago, sem casca; F_{SC} – Fogo, sem casca; F_{CC} – Fogo, com casca; n.d. – não determinado

O índice de iodo, para ambas as variedades e para os óleos obtidos a partir das sementes com casca e sem casca, encontra-se abaixo do limite máximo estabelecido na norma europeia (120 g I₂/100 g), o que abona a favor da utilização deste tipo de oleaginosa como matéria-prima para a produção de biodiesel quando comparada, por exemplo, com o óleo de soja (132 g I₂/100 g) ou o óleo de girassol (133 g I₂/100 g) (Farmani *et al.*, 2007; Moser, 2011). Os valores obtidos para este parâmetro, que reflete o grau de insaturação do óleo, indicam que a variedade proveniente da ilha do Fogo apresentou um teor de ácidos gordos insaturados um pouco superior à variedade de Santiago, o que foi confirmado quando se procedeu à avaliação da composição dos óleos em termos da sua composição em ácidos gordos (quadro 3.4.).

O índice de saponificação dos óleos extraídos das sementes provenientes de Santiago e do Fogo foi semelhante, sendo comparável com o valor de 192 mg KOH/g indicado por fontes bibliográficas para uma variedade de Cabo Verde (Parawira, 2010). Este parâmetro permitiu a determinação do peso molecular dos óleos, com base na equação referida em 2.6.2.1.

O índice de acidez, para ambas as variedades, situou-se acima dos 2 mg KOH/g estabelecidos como limite máximo para que um processo de transesterificação alcalina seja levado a cabo de um modo eficiente (Parawira, 2010). Assim, haverá necessidade de realizar um pré-tratamento da matéria-prima relativamente ao índice de acidez, no caso de se pretender obter ésteres metílicos através de catálise básica.

A quantidade de fósforo determinada excede o limite de 4 mg/kg estabelecidos na norma europeia para biodiesel. Esta quantidade de fósforo poderá ser reduzida mediante degomagem e neutralização do óleo.

Quadro 3.4. Composição em ácidos gordos das duas variedades de *Jatropha curcas*.

Ésteres Metílicos	% (m/m)		
	S	F _{sc}	F _{cc}
C16:0 (Palmítico)	14,2	14,5	14,7
C16:1 (Palmitoleico)	0,1	0,1	0,1
C18:0 (Esteárico)	7,8	5,9	6,0
C18:1 (Oleico)	47,4	37,5	36,9
C18:2 (Linoleico)	27,6	39,8	39,7
C18:3 (Linolénico)	0,2	0,2	0,2
C20:0 (Eicosanóico)	0,2	0,2	0,2
C20:1 (Eicosenóico)	0,1	0,1	0,0
C22:0 (Docosanóico)	n.d.	n.d.	n.d.
C24:0 (Tetracosanóico)	n.d.	n.d.	0,1
Saturados	22,3	20,7	21,0
Insaturados	75,4	77,7	77,0
➤ Monoinsaturados	47,6	37,7	37,0

S – Santiago, sem casca; F_{sc} – Fogo, sem casca; F_{cc} – Fogo, com casca
n.d. – não detetado

A composição em ácidos gordos (quadro 3.4) não é alterada pelo processo de transesterificação, correspondendo assim ao biodiesel a mesma composição encontrada no óleo que lhe deu origem (Knothe, 2005). Neste estudo, é relevante notar as diferenças entre as duas variedades (quadro 3.4.): enquanto a variedade de Santiago foi caracterizada pelo predomínio do ácido oleico (47%) sobre o ácido linoleico (28%), na variedade do Fogo sucedeu o inverso, correspondendo cerca de 40% a ácido linoleico e cerca de 37% a ácido oleico. Estes resultados são consistentes com os publicados por Heller (Heller, 1996), respeitante à caracterização de sementes provenientes das ilhas de Santiago e Fogo. Todavia, várias fontes bibliográficas (Araújo *et al.*, 2007; Parawira, 2010), no que diz respeito à variedade de Cabo Verde, indicam uma composição de: 44,7% de ácido oleico, 31,4% de ácido linoleico, 15,1% de ácido palmítico e 7,1% de ácido esteárico (para nenhum dos restantes ácidos gordos é atribuído um valor igual ou superior a 1%), não sendo especificadas diferenças interilhas. Relativamente aos óleos analisados no presente trabalho, o teor de ácido linolénico cumpriu largamente o especificado na norma EN 14214, que indica um limite máximo de 12% (m/m) para este parâmetro. Para ambas as variedades o teor neste ácido foi de 0,2%, o que é um bom indicador para a estabilidade do óleo de *Jatropha curcas*. Um ácido com 3 ligações duplas,

como é o caso do linolénico, seria bastante suscetível a reações de oxidação, o que originaria a degradação do óleo e do biodiesel (Puhan *et al.*, 2010).

3.1.2. Caracterização do lote obtido em agosto de 2010 (segundo lote)

A extração do óleo do segundo lote foi feita por intermédio de uma prensa mecânica, utilizando seletores de pressão com bocas de tubulação de diferentes diâmetros (10 e 14 mm) conforme descrito em 2.4.2.2. Foram processados cerca de 8 kg de sementes de Santiago e 5 kg do Fogo, sem se proceder a descasque (quadro 3.5.).

Quadro 3.5. Percentagem de óleo extraído das duas variedades de sementes de *Jatropha curcas* por prensa mecânica, utilizando seletores de pressão com bocas de tubulação de diferente diâmetro (10 e 14 mm).

Parâmetro	Fogo 14	Fogo 10	Sant.14	Sant. 10
Massa de sementes para extração do óleo (g)	4000,2	1184,1	4000,4	4000,1
Óleo bruto extraído (% m/m)	20,0	26,2	21,0	28,4
Óleo extraído (% m/m), após decantação	14,8	18,7	14,8	19,3
Bagaço (% m/m)	79,0	71,5	78,0	70,0
Óleo extraído a partir do bagaço (% m/m, em função do bagaço)	21,6	14,0	21,08	14,5
Teor de humidade - bagaço (% m/m)	8,84	8,88	8,81	8,5
Óleo extraído a partir do bagaço (% m/m, base seca)	23,6	15,3	23,12	15,82
Óleo total na amostra (% m/m)	31,8	28,7	31,2	29,5

A diferença da pressão produzida pelos diferentes seletores de pressão é a causa da diferença observada relativamente à percentagem de óleo extraído – o aumento da pressão origina temperaturas mais elevadas, o que por sua vez aumenta a eficiência da extração do óleo (Karaj *et al.*, 2011). Nos ensaios em que se utilizou o seletor de pressão com a boca de tubulação de 10 mm de diâmetro a percentagem de óleo extraído foi maior para ambas as variedades.

Comparativamente com a extração com solvente, onde a quase totalidade de óleo contido na semente é retirado, a extração mecânica teve um rendimento inferior. Contudo, o recurso a este método é necessário, em diversos países em desenvolvimento, devido ao baixo custo e facilidade de manuseamento, sendo o que mais prontamente permite a extração de grandes quantidades de óleo. Na extração mecânica pode-se conseguir obter 86 a 92% do óleo total contido numa semente (Pradhan *et al.*, 2011), enquanto na extração com solvente é possível obter até 99% do óleo. Porém, nos ensaios realizados, o óleo extraído por prensagem, excluindo as lamas eliminadas por decantação (figura 3.1.) representa 47% (para a extração do óleo do Fogo com seletor de pressão com boca de tubulação de 14 mm) e 65% (para o extração do óleo do Fogo com seletor de pressão com boca de tubulação de 10 mm) do máximo teórico de óleo na amostra, tendo como referência a quantidade total de óleo calculada com base na soma ponderada do óleo extraído do bagaço com solvente e do óleo extraído por

prensagem. Este baixo valor poderá explicar-se pela ausência de pré-tratamento das sementes oleaginosas, nomeadamente a limpeza, secagem ou cozedura, sendo as duas últimas de particular importância. A cozedura antes da prensagem melhora, geralmente, o rendimento em óleo, por diminuir a sua viscosidade e ajustar a humidade à quantidade ótima para a prensagem, o que permite que o óleo flua mais prontamente (Pradhan *et al.*, 2011). Por outro lado, Chen *et al.* (2008) apresentam dados que apontam para um rendimento de 50% da extração mecânica em relação ao máximo teórico obtido na extração com solvente, o que se aproxima do obtido neste trabalho, não mencionando, no entanto, se se tratam de extrações a partir da semente na íntegra ou apenas da amêndoa.

Note-se, ainda, que o bagaço apresentava uma quantidade assinalável de óleo residual. O teor de óleo no bagaço foi determinado através da extração com solvente de uma porção-teste. Tendo em conta valores absolutos, a quantidade de óleo presente no bagaço era superior à quantidade de óleo extraído na prensa no caso do seletor de pressão com boca de tubulação de 14 mm. É, assim, importante otimizar o processo de extração mecânica com o intuito de diminuir o óleo residual presente no bagaço, que poderá ser indevidamente desperdiçado.

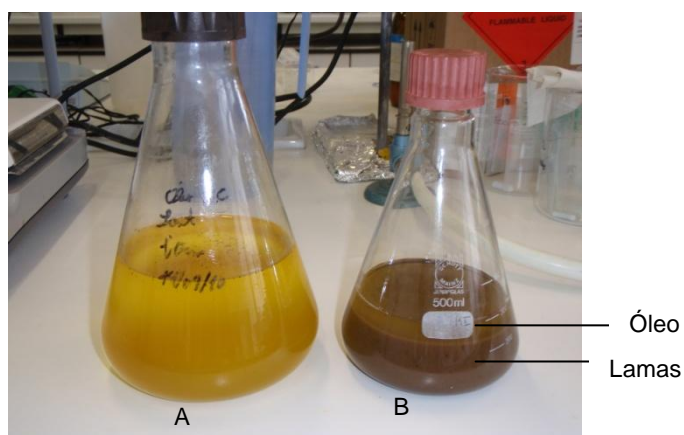


Figura 3.1. (A) óleo de sementes de Santiago extraído com seletor de pressão com boca de tubulação de 10 mm (S10), após 1ª decantação; (B) óleo/lamas S10 submetido a 2ª decantação.

Os quatro óleos obtidos por prensagem foram então caracterizados (quadro 3.6.) nos mesmos parâmetros que os óleos obtidos por extração com solvente.

Quadro 3.6. Caracterização dos óleos de *Jatropha curcas* obtidos por prensagem mecânica.

Amostra	Índice de Acidez (mg KOH/g)	Índice de Saponificação (mg KOH/g)	Peso Molecular (g/mol)	Índice de Iodo (g I ₂ /100g)
Sant. 10	1,6	207,7	808,9	102
Sant. 14	1,7	213,1	788,2	100,8
Fogo 10	8,1	192,3	873,5	n.d.
Fogo 14	6,3	203,1	827,3	95,3

n.d. – não determinado

À semelhança do que se verificou no primeiro lote, e apesar das variações nos valores, o índice de acidez foi mais elevado para as sementes provenientes da ilha do Fogo. Não se verificaram diferenças significativas neste parâmetro entre a “Sant. 10” e “Sant. 14”, mas o mesmo não pode ser dito da “Fogo 10” e “Fogo 14”. Neste caso, mais óleo foi extraído com o seletor de pressão com boca de tubulação com 10 mm, o que também terá significado que mais substâncias indesejáveis, capazes de causar aumento no índice de acidez, tenham sido extraídas. O índice de saponificação apresentou diferenças pouco acentuadas e o índice de iodo foi inferior ao limite máximo estipulado na EN 14214.

O perfil lipídico para este novo lote de óleos foi também determinado (quadro 3.7.), apresentando diferenças em relação ao lote de abril.

Quadro 3.7. Composição em ácidos gordos dos óleos extraídos em agosto.

Ésteres Metílicos	% (m/m)		
	Sant. 10	Sant. 14	Fogo 14
C16:0 (Palmítico)	16,2	15,7	15,8
C16:1 (Palmitoleico)	0,1	0,0	1,0
C18:0 (Esteárico)	5,1	5,2	6,2
C18:1 (Oleico)	35,1	35,1	40,0
C18:2 (Linoleico)	41,1	40,8	34,6
C18:3 (Linolénico)	0,2	n.d.	n.d.
C20:0 (Eicosanóico)	n.d.	n.d.	n.d.
C20:1 (Eicosenóico)	n.d.	n.d.	n.d.
C22:0 (Docosanóico)	n.d.	n.d.	0,1
C24:0 (Tetracosanóico)	n.d.	n.d.	n.d.
Saturados	21,4	20,9	22,1
Insaturados	76,5	75,9	75,6
➤ Monoinsaturados	35,2	35,1	41,0

n.d. – não detetado

O óleo extraído das sementes de Santiago mostrou predominância do ácido linoleico em relação ao oleico, o que explica o valor mais elevado do índice de iodo (quadro 3.6.) quer em relação ao óleo extraído das sementes do Fogo quer ao extraído do 1º lote das sementes de Santiago. Esta variância no perfil lipídico de sementes com origem na mesma ilha é confirmada por estudos de Correia (Correia, 2009), que caracterizou 6 sementes oriundas de diferentes zonas da ilha de Santiago (quadro 3.8.):

Quadro 3.8. Composição em ácidos gordos de amostras de sementes de Santiago (Correia, 2009).

Ésteres Metílicos	% (m/m)					
	1	2	3	4	5	6
C16:0 (Palmítico)	19,6	17,9	19,1	17,2	17,5	16,3
C16:1 (Palmitoleico)	2,1	1,6	1,3	1,5	1,7	1,5
C18:0 (Estearico)	6,2	5,7	6,1	6,3	4,6	5,6
C18:1 (Oleico)	35,0	34,4	37,1	37,4	32,9	36,7
C18:2 (Linoleico)	36,1	38,6	35,5	36,9	42,6	38,9
C18:3 (Linolénico)	0,3	0,3	0,5	0,4	0,4	0,4
C20:0 (Eicosanóico)	n.d.	0,1	0,1	0,1	n.d.	0,2
C20:1 (Eicosenóico)	0,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
C22:0 (Docosanóico)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
C24:0 (Tetracosanóico)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d. – não detetado

A variação da composição lipídica dos diferentes óleos de *Jatropha curcas* em Santiago (quadro 3.8), aliados aos dados obtidos no presente estudo, remetem para a influência que variáveis como o tipo de solo podem ter nas características da planta.

3.1.2.1. Índice de acidez – influência de métodos de pré-tratamento

O índice de acidez de um óleo é fator limitante na transesterificação alcalina, sendo o elevado teor de ácidos gordos livres responsável pela formação de sabões, por reação com o catalisador básico, o que resulta numa menor conversão em ésteres metílicos.

Após os primeiros ensaios de caracterização do lote de agosto, e atendendo à peculiar diferença no índice de acidez entre as sementes de Santiago e as do Fogo, tornou-se interessante submeter o óleo obtido a partir das sementes do Fogo a um processo de neutralização visando diminuir o seu índice de acidez. Por questões relacionadas com a limitação quantitativa do óleo das sementes “Fogo 10”, cujo índice de acidez era mais elevado, os ensaios de neutralização foram efetuados com o óleo “Fogo 14”, seguindo o procedimento descrito em 2.5.2. Previamente os óleos foram sujeitos a um processo de degomagem, conforme descrito em 2.5.1., de modo a retirar algumas substâncias tais como fosfolípidos ou gomas.

A degomagem não provocou alteração significativa do índice de acidez do óleo bruto (quadro 3.9), enquanto a neutralização do óleo “Fogo 14” permitiu baixar o seu índice de acidez, tendo-se obtido com uma solução de hidróxido de sódio de molaridade igual ou superior a 2 M um valor de índice de acidez que já permite a realização do processo de transesterificação alcalina sem perda significativa no rendimento ($IA < 2 \text{ mg KOH/g}$). Como se pode observar na figura 3.2,

o índice de acidez variou linearmente com o aumento da molaridade da solução alcalina, correspondendo ao valor de 1,3 M um índice de acidez igual a 2 mg KOH/g (figura 3.2.).

Quadro 3.9. Índices de acidez para o óleo F14 bruto, degomado e neutralizado com soluções de NaOH de diferentes molaridades.

Parâmetro	OB	ODA	ODE	ON (1M)	ON (2M)	ON (3M)	ON (5M)
Índice de Acidez (mg KOH/g)	6,3	6,3	6,6	2,445	0,947	0,160	0,000

OB – óleo bruto.

ODA – óleo submetido a degomagem com água

ODE – óleo submetido a degomagem com ácido fosfórico.

ON ("X"M) – óleo neutralizado com uma solução de hidróxido de sódio de molaridade "X M", após degomagem.

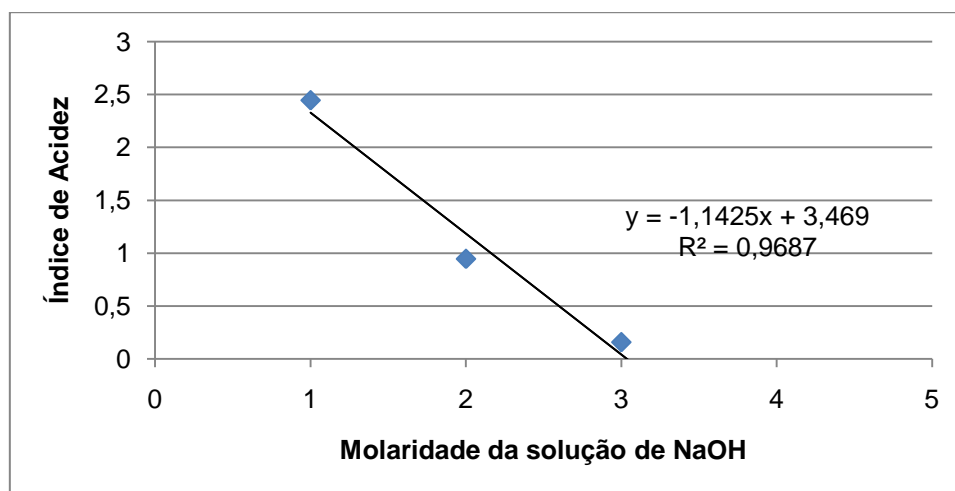


Figura 3.2. Influência da molaridade da solução de neutralização na redução do índice de acidez do óleo.

3.1.2.2. Teor de fósforo

Dado que as sementes do Fogo haviam revelado ter maior quantidade de fósforo aquando das determinações no lote de abril, os estudos relativos a este parâmetro foram realizados com o óleo extraído do lote de agosto proveniente desta ilha (Fogo 14).

Embora o teor de fósforo presente neste óleo (quadro 3.10) seja bastante inferior ao do lote de abril (quadro 3.3.), não deixando de ser muito superior ao limite estabelecido na norma EN 14214 (4 mg/kg), a degomagem permitiu reduzir, tal como era esperado, o conteúdo em fósforo, num máximo de cerca de 50% do valor inicial, sendo mais efetiva a degomagem com ácido fosfórico devido à eliminação de fosfatídeos não-hidratáveis. No entanto, quando a degomagem foi sucedida de neutralização, obteve-se um valor de fósforo inferior ao especificado para biodiesel, com uma solução de NaOH com molaridade de 5 M (quadro 3.10). A neutralização, apesar de ser inicialmente empregue para a diminuição do índice de acidez, terá contribuído para a diminuição do teor de fósforo por facilitar a remoção de substâncias dissolvidas no óleo, incluindo fosfatídeos residuais. Fica assim a hipótese do teor de fósforo poder ser diminuído com alterações nos parâmetros do processo de degomagem, ou

realizando duas degomagens sucessivas, o que replicaria o efeito da neutralização que sucedeu a degomagem. Um teor de fósforo de cerca 50 mg/kg é o suficiente para reduzir entre 3 e 5% o rendimento em ésteres metílicos (Lu *et al.*, 2009).

Quadro 3.10. Teor de fósforo para o óleo “Fogo 14” bruto, após degomagem e após neutralização.

Amostras	Teor de Fósforo (mg/kg)
Óleo Bruto	41,484
Óleo Degomado - água	25,996
Óleo Degomado – ácido fosfórico	20,984
Óleo Neutralizado (1M)	7,590
Óleo Neutralizado (5M)	0,783

3.1.2.3. Estabilidade à oxidação

Na base dos mecanismos de oxidação está a insaturação das cadeias de ácidos gordos e, particularmente, a existência dos grupos alilo e duplo-alilo, regiões mais reativas. Fatores como a presença de ar, a temperatura, a presença de antioxidantes, os traços de metais, a natureza do recipiente onde se armazena o óleo ou o biodiesel e a superfície de contato com o ar também podem influenciar a estabilidade à oxidação (Knothe, 2007), que tende a diminuir com o aumento do tempo de armazenamento.

Foi determinada a estabilidade à oxidação do óleo “Sant. 10”, que foi o utilizado para os ensaios de otimização da transesterificação enzimática. Atendendo ao perfil lipídico, e relembrando a preponderância dos grupos alilo e duplo-alilo na estabilidade oxidativa, seria expectável que os óleos de Santiago tivessem estabilidade oxidativa inferior aos óleos do Fogo, devido à maior percentagem de ácido linoleico em relação ao oleico.

O período mínimo de indução estabelecido pela norma EN 14214 (6 horas) é claramente cumprido (quadro 3.11.), o que será indicador de que o biodiesel produzido a partir do óleo “Sant. 10” também cumpra o requisito.

A diferença no tempo de indução entre as duas amostras deve-se, provavelmente, ao facto do processo de degomagem remover uma percentagem dos antioxidantes naturais presentes no óleo (Knothe, 2007).

Quadro 3.11. Estabilidade oxidativa para o óleo das sementes “S10”, antes e pós-degomagem.

Amostra	Estabilidade Oxidativa (h)
Óleo não degomado	10,66
Óleo degomado	9,24

É referida na literatura uma elevada variação na estabilidade à oxidação do biodiesel produzido a partir do óleo de *Jatropha curcas*, desde 3,23 (Sarin *et al.*, 2007) a 8,17 horas (Choi *et al.*, 2008).

3.2. Transesterificação alcalina do óleo de *Jatropha curcas*

Conforme descrito em 2.9.1., o processo de transesterificação alcalina foi efetuado segundo 3 procedimentos distintos.

Utilizou-se o óleo “F10”, cujo índice de acidez era mais elevado (8,1 mg KOH/g), para que se pudesse aferir o efeito que a acidez do óleo teria sobre a conversão em ésteres metílicos de acordo com os diferentes métodos de tratamento.

3.2.1. Catálise básica precedida de neutralização

Após degomagem, o óleo foi neutralizado com uma solução de hidróxido de sódio de molaridade 3M, tendo-se avaliado o índice de acidez, que diminuiu para 0,242 mg KOH/g. O óleo pré-tratado foi então sujeito à reação de transesterificação básica nas condições apresentadas no quadro 3.12.

Quadro 3.12. Condições da catálise básica e teor de ésteres metílicos obtido.

Reagentes	Quantidade (g)	Ésteres metílicos (% m/m)
Óleo	18,67	99,9
Metanol	4,2851 ⁽¹⁾	
NaOH	0,1936 ⁽²⁾	

⁽¹⁾ Razão molar metanol:óleo – 6:1; ⁽²⁾ Catalisador – 1% (m/m)

O teor de ésteres metílicos obtido (quadro 3.12) é superior aos 96,5% requeridos na EN 14214, o que indica que as condições otimizadas em estudos anteriores (razão molar metanol:óleo de 6.1 e 1% de catalisador) são adequadas para a transesterificação alcalina do óleo desta variedade de *Jatropha curcas*.

3.2.2. Catálise básica precedida de catálise ácida

Neste estudo foi realizada a transesterificação básica do óleo após este ter sofrido um pré-tratamento por catálise ácida. Nos quadros 3.13 e 3.14. estão indicadas as condições utilizadas em ambos os processos, tendo-se realizado inicialmente a degomagem do óleo bruto, bem como os teores de ésteres metílicos obtidos em cada ensaio.

Quadro 3.13. Condições da catálise ácida e teor de ésteres metílicos obtido.

Reagentes	Quantidade (g)	Ésteres metílicos (%)
Óleo	25,53	4,7
Ácido sulfúrico	0,2313 ⁽¹⁾	
Metanol	3,7781 ⁽²⁾	

⁽¹⁾ Catalisador – 20% m/m (em função da acidez); ⁽²⁾ Razão molar álcool:ácidos gordos livres – 30:1

O índice de acidez, após a catálise ácida, diminuiu de 8,1 para 0,6 mg KOH/g, o que significa que o procedimento foi eficaz na conversão dos ácidos gordos livres em ésteres metílicos. Neste passo obteve-se um teor de ésteres de 4,7%.

No passo seguinte da catálise básica, além da quantidade de catalisador para reação (1%) foi adicionada a quantidade necessária para neutralizar os ácidos gordos livres ainda presentes no óleo.

Quadro 3.14. Condições da catálise básica e teor de ésteres metílicos, após catálise ácida.

Parâmetros	Quantidade (g)	Ésteres metílicos (%)
Óleo	12,5	97,2
Hidróxido de Sódio	0,1302 ⁽¹⁾	
Metanol	2,7599 ⁽²⁾	

⁽¹⁾ Catalisador – quantidade total de NaOH adicionada; ⁽²⁾ Razão molar álcool:óleo – 6:1.

O teor de ésteres metílicos obtido no final do processo foi de 97,2%, valor superior aos 96,5% exigidos pela norma EN 14214. Estes resultados mostram que o pré-tratamento do óleo de *Jatropha curcas* mediante catálise ácida mostra ser uma alternativa a integrar no processo de produção de biodiesel a partir de óleos com elevado teor de ácidos gordos livres.

3.2.3. Catálise básica sem pré-tratamento do óleo

Neste método, à degomagem do óleo sucedeu-se a catálise básica, tendo-se adicionado quantidade suficiente de catalisador para neutralizar os ácidos gordos livres, o que neste caso foi uma quantidade significativa dado que o índice de acidez após a degomagem foi de 8,3 mg KOH/g.

O teor de ésteres metílicos obtido foi superior ao limite estabelecido na norma (quadro 3.15.), embora se tenha observado uma elevada perda de rendimento mássico em virtude da formação de sabões, derivada do elevado teor de ácidos gordos livres presentes no óleo.

Quadro 3.15. Condições da catálise básica e teor de ésteres metílicos obtido.

Parâmetros	Quantidade (g)	Porcentagem de ésteres metílicos
Óleo	9,48	99,9
Hidróxido de Sódio	0,1609 ⁽¹⁾	
Metanol	2,223 ⁽²⁾	

⁽¹⁾ Catalisador – 1% (m/m), acrescido de quantidade suficiente para neutralizar os ácidos gordos livres; ⁽²⁾ Razão molar álcool:óleo – 6:1

Os 3 procedimentos efetuados para a produção de biodiesel por via alcalina permitiram a obtenção de ésteres metílicos em teor superior a 96,5%, o que confirma que os valores otimizados em estudos anteriores são perfeitamente aplicáveis para esta variedade de *Jatropha curcas*. A escolha do procedimento mais favorável, para a produção de biodiesel em larga escala, teria de ser feita com base numa avaliação económica das várias etapas de pré-tratamento.

3.3. Transesterificação enzimática do óleo de *Jatropha curcas*

3.3.1. Otimização das condições reacionais - Desenho Composto Central a 4 variáveis

Ponto fulcral deste trabalho, os ensaios de transesterificação enzimática do óleo de *Jatropha curcas* visavam a otimização do teor de ésteres metílicos obtidos por intermédio da metodologia da superfície de resposta, conforme descrito em 2.9.2.1.

Foram realizados 27 ensaios definidos no desenho composto central a 4 variáveis (quadro 3.16), tendo-se utilizado em todos os ensaios 10 g de óleo.

Quadro 3.16. Percentagem de ésteres metílicos obtidos com o óleo de purgueira para os ensaios definidos no desenho composto central; M – razão molar metanol:óleo; L – quantidade de lipase; A – água adicionada à mistura reacional.

Ensaio s	Variáveis Independentes				Variável dependente – Teor de ésteres metílicos (%)
	T (°C)	M	L (g)	A (%)	
1	27,5	6:1	72,6	6	74,7
2	42,5	6:1	72,6	6	27,0
3	27,5	12:1	72,6	6	8,9
4	42,5	12:1	72,6	6	16,0
5	27,5	6:1	121,0	6	54,2
6	42,5	6:1	121,0	6	20,7
7	27,5	12:1	121,0	6	19,1
8	42,5	12:1	121,0	6	14,1
9	27,5	6:1	72,6	18	97,4
10	42,5	6:1	72,6	18	93,1
11	27,5	12:1	72,6	18	20,8
12	42,5	12:1	72,6	18	46,2
13	27,5	6:1	121,0	18	95,5
14	42,5	6:1	121,0	18	95,2
15	27,5	12:1	121,0	18	89,3
16	42,5	12:1	121,0	18	34,85
17	20	9:1	96,8	12	97,1
18	50	9:1	96,8	12	23,6
19	35	3:1	96,8	12	64,5
20	35	15:1	96,8	12	67,6
21	35	9:1	48,4	12	62,5
22	35	9:1	145,2	12	58,8
23	35	9:1	96,8	0	1,6
24	35	9:1	96,8	24	96,3
25	35	9:1	96,8	12	61,0
26	35	9:1	96,8	12	61,6
27	35	9:1	96,8	12	60,8

A enzima Lipozyme TL IM, lipase comercial da *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em gel de sílica, que conduziu a melhores resultados com outros óleos vegetais em trabalhos anteriores (Simas *et al.*, 2009), foi a escolhida para os ensaios de transesterificação enzimática. A determinação da concentração proteica da enzima imobilizada, pela metodologia de Lowry, foi feita por comparação com uma solução de albumina de soro bovino (ver 2.7.1.). Na figura 3.3. encontra-se a reta de calibração obtida e a respetiva equação da reta, que permitiu determinar a concentração de proteína da enzima em estudo (quadro 3.17.)

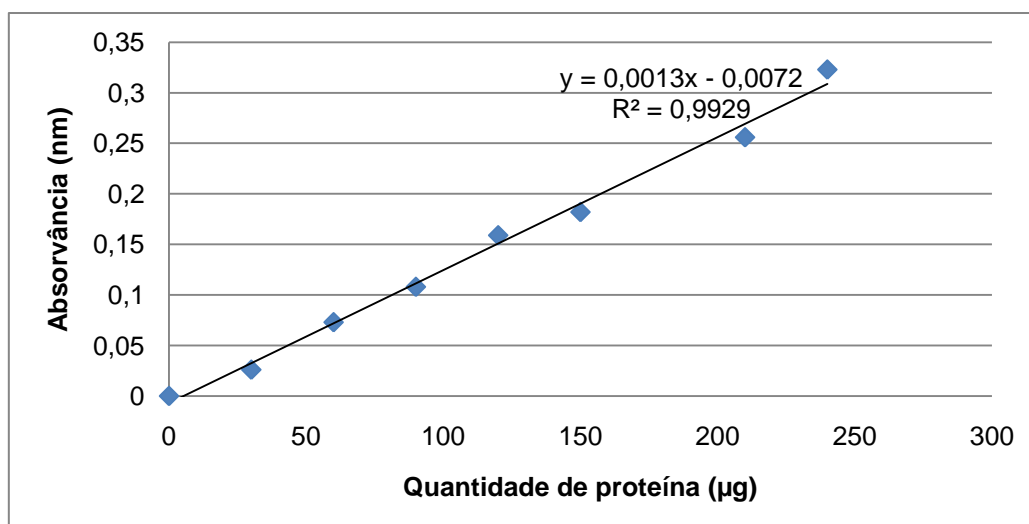


Figura 3.3. Retra de calibração da solução de albumina de soro bovino.

Quadro 3.17. Teor proteico da enzima Lipozyme TL IM.

Lipase	Teor proteico (mg/g suporte)
Lipozyme TL IM	96,8

Conhecido o teor proteico, foi calculada a quantidade de lipase que seria necessária adicionar, em cada caso, incluindo o suporte de imobilização, para a transesterificação de 10 g de óleo (quadro 3.18.).

Quadro 3.18. Quantidade de lipase definida para os diferentes ensaios com a Lipozyme TL IM.

Enzima	Quantidade lipase pura (mg)	Quantidade lipase pura (% m/m em relação ao óleo)	Quantidade lipase + suporte (mg)	Quantidade lipase + suporte (% m/m em relação ao óleo)
Lipozyme TL IM	48,4	0,484	500	5
	72,6	0,726	750	7,5
	96,8	0,968	1000	10
	121,0	1,210	1250	12,5
	145,2	1,452	1500	15

Posteriormente, foi calculada a quantidade de metanol, em gramas, que seria necessário adicionar para as diferentes razões molares definidas e que correspondem a ensaios com 10 g de óleo de purgueira (quadro 3.19.).

Quadro 3.19. Correspondência do metanol, em gramas, para as razões molares metanol:óleo definidas nos ensaios do desenho composto central a 4 variáveis.

Razão molar metanol:óleo	Quantidade de metanol (g)
3:1	1,1882
6:1	2,3764
9:1	3,5646
12:1	4,7529
15:1	5,9411

Os ensaios de transesterificação foram realizados aleatoriamente, como referido em 2.9.2.1.

De referir que foi frequente a ocorrência de inversão de fases após reação, com o glicerol a ser o sobrenadante, o que, todavia, não causou dificuldades na recolha da fase orgânica, havendo uma distinta separação das fases. Os grânulos de Lipozyme TL IM desfizeram-se em vários ensaios, formando-se subsequentemente uma mistura branca pastosa. Nesses casos, houve necessidade de proceder à centrifugação por duas vezes.

O teor de ésteres, obtido após as 18 horas de ensaio, apresentou grande variação, sendo 1,6% o valor mais baixo obtido, correspondendo ao ensaio 23 (quadro 3.16.), nas condições de 35° C de temperatura, razão molar metanol:óleo de 9:1, 96,8 mg de lipase pura e sem adição de água. O maior rendimento em ésteres (97,4%) verificou-se no ensaio 9, nas condições de 27,5°C de temperatura, razão molar metanol:óleo de 6:1, 72,6 g de lipase pura e 18% de água. Numa primeira análise dos resultados sobressai a importância da quantidade de água no teor de ésteres metílicos obtido: dos 6 resultados superiores a 90%, 5 correspondem a ensaios em que se adicionou pelo menos de 18% (m/m) de água ao óleo, e os 6 ensaios onde o teor de ésteres metílicos foi menor correspondem à adição de até 6% (m/m) de água ao sistema. No que diz respeito às outras variáveis independentes, verifica-se que o aumento da temperatura ou da razão molar, estando as restantes variáveis constantes, correspondeu a um decréscimo no teor de ésteres metílicos. A variação da quantidade de lipase pura parece ter tido um efeito negligenciável.

Recorreu-se ao programa “Statistica 8” para o estudo pormenorizado dos resultados, nomeadamente o efeito de cada um dos parâmetros e da interação entre os mesmos no teor de ésteres metílicos obtido, a determinação dos coeficientes polinomiais e o cálculo dos resultados teoricamente previsíveis.

A equação polinomial obtida para o sistema foi a seguinte (3.1):

$$\begin{aligned} \text{Teor de ésteres} = & 92,8749 + 0,8005T - 0,0288T^2 - 14,2302M - 0,0216M^2 + \\ & 0,3478L - 0,0026L^2 + 3,5002A - 0,1241A^2 + 0,1635TM - 0,0254TL + 0,0633TA + \\ & 0,0793ML - 0,2484MA + 0,0326LA. \end{aligned} \quad 3.1$$

As interações entre mais de 2 parâmetros não foram tidas em consideração.

O quadro 3.20 apresenta a comparação entre os valores reais e os valores teóricos, de acordo com a equação polinomial.

Quadro 3.20. Valores teóricos do teor de ésteres metílicos, calculados a partir da equação polinomial para os ensaios do desenho composto central, em comparação com os valores reais.

Ensaio	Teor de ésteres metílicos (% m/m)	
	Valores reais	Valores teóricos
1	74,7	61,5
2	27,0	36,1
3	8,9	26,4
4	16,0	15,6
5	54,2	52,7
6	20,7	8,8
7	19,1	40,6
8	14,1	11,4
9	97,4	99,2
10	93,1	85,1
11	20,8	46,2
12	46,2	46,8
13	95,5	100,0
14	95,2	76,8
15	89,3	79,3
16	34,85	61,5
17	97,1	76,6
18	23,6	33,3
19	64,5	85,8
20	67,6	35,4
21	62,5	52,4
22	58,8	58,2
23	1,6	0,0
24	96,3	87,4
25	61,0	61,4
26	61,6	
27	60,8	

De acordo com os valores teóricos, ao ensaio 23 corresponderia o menor teor de ésteres metílicos, o que corrobora o resultado efetivamente obtido no ensaio real. O ensaio 13, efetuado nas condições de temperatura igual a 27,5°C, 6:1 de razão molar, 121 mg de lipase pura e 18% de água teria o teor máximo de ésteres metílicos (obteve-se o valor teórico de 109,3%); de facto, o valor real de 95,5% fica um pouco abaixo do valor mínimo para que se cumpra a norma EN 14214 (96,5%), sendo inferior aos 97,4% correspondentes ao nono ensaio, cuja estimativa teórica seria de 99,2% de ésteres metílicos.

O coeficiente de determinação, R^2 , para o modelo é igual a 0,79, o que é o mesmo que dizer que 79% da variância do sistema pode ser atribuída às variáveis independentes, podendo ser explicada pelo modelo. Este valor fica abaixo do que seria ideal, havendo alguma dispersão dos resultados obtidos. Isso é ilustrado pelo facto de 11 ensaios apresentarem uma diferença entre o valor real e o teórico superior a 10 pontos percentuais. Note-se que foram efetuadas repetições para alguns dos ensaios para os quais os valores obtidos em ésteres metílicos suscitavam maiores dúvidas, tendo-se confirmado os resultados do ensaio inicial.

O quadro 3.21. apresenta as estimativas dos efeitos das variáveis independentes e interações no sistema, conforme determinados pelo “Statistica 8”.

Quadro 3.21. Estimativas dos efeitos dos parâmetros e interações entre os mesmos no teor de ésteres metílicos e correspondente valor de p , determinado pelo Statistica 8.

Parâmetro	Estimativa do efeito	p
Água	43,9	0,000
Razão molar metanol:óleo	-25,3	0,013
Temperatura	-21,6	0,028
Lipase	2,6	0,768
Interação razão molar/lipase	11,5	0,300
Interação lipase/água	9,5	0,390
Interação temperatura/lipase	-9,2	0,403
Interação razão molar/água	-8,9	0,416
Interação temperatura/razão molar	7,4	0,502
Interação temperatura/água	5,7	0,602

As estimativas dos efeitos confirmam a análise prévia, sendo notória a importância da quantidade de água adicionada no sistema reacional - quanto maior o valor absoluto, maior o impacto da variação do parâmetro no valor de ésteres obtido. O sinal negativo ou positivo pressupõe que aumentando o valor de determinado parâmetro o teor de ésteres metílicos tende a ser menor ou maior, respetivamente. O valor de p calculado permite aferir a significância das estimativas dos efeitos, pois no sistema alguns valores podem ser gerados por “ruído”, e não por possuírem, de facto, um efeito significativo sobre a alteração no conteúdo de ésteres. Assim sendo, só para valores de p inferiores a 0,05 se poderia considerar o efeito como sendo estatisticamente significativo. Deste modo, foram considerados como estatisticamente significativos os efeitos da água, da temperatura e da razão molar metanol:óleo, uma vez que os valores de p foram inferiores a 0,05.

O aumento do teor de água, mantendo as outras variáveis constantes, de 6 para 18% em relação à massa de óleo, provocou, no sistema estudado, um aumento do teor de ésteres de 43,9%. O aumento da razão molar de 6:1 para 12:1, e da temperatura de 27,5 para 42,5°C, independentemente das outras variáveis, originaram uma diminuição no teor de ésteres metílicos de 25,3 e 21,6%, respetivamente. Não há nenhuma interação entre as variáveis

independentes que seja significativa, sendo de notar que a quantidade de lipase pura não tem grande relevância no teor de ésteres metílicos obtido. Sendo o custo da enzima um dos principais entraves ao recurso à transesterificação enzimática, a possibilidade de usar menor quantidade de lipase sem que isso corresponda a valores de ésteres metílicos inferiores ao estipulado pela EN 14214 é uma possibilidade aliciante.

A importância da água neste sistema prende-se com o facto de manter a enzima na configuração ativa (Rodrigues *et al.*, 2008), i.e., com o aumento da quantidade de água a molécula adquire maior flexibilidade, o que origina a configuração estrutural aberta da lipase, correspondendo ao aumento da atividade catalítica (Khor *et al.*, 2010). Todavia, é expectável que se atinja um patamar ótimo da quantidade de água, acima do qual o excesso de água causaria diminuição do teor de ésteres metílicos – isso acontece porque a água está também envolvida em processos de inativação enzimática, além de participar na hidrólise dos ésteres resultantes da transesterificação, quando presente em quantidade excessiva (Juan *et al.*, 2011). Acrescente-se que a adição excessiva de água poderia aumentar a espessura da camada de água em redor da enzima, o que prejudica a difusão do substrato orgânico e dos produtos para e a partir do centro ativo da lipase (Khor *et al.*, 2010).

A razão molar metanol:óleo estequiometricamente definida para a transesterificação seria de 3:1. Contudo, é usual usar-se uma razão molar superior (e.g., 6:1) para forçar a reação a decorrer no sentido da produção de ésteres metílicos. No entanto, a estimativa do efeito do metanol aponta para a diminuição do teor de ésteres metílicos com o aumento da razão molar – uma razão metanol:óleo elevada origina uma elevada polaridade do meio, o que está associada à inativação da atividade enzimática, diminuindo assim a atividade catalítica (Rodrigues *et al.*, 2008). Alguns estudos indicam haver uma maior suscetibilidade à inativação pelo álcool para a Lipozyme TL IM em relação a outras lipases, obtendo-se melhores resultados com razões molares baixas: Hernández-Martin *et al.* (2008) notaram um decréscimo no teor de ésteres quando a razão molar era superior a 2:1, em ensaios em que foi utilizado etanol como álcool reacional e diferentes óleos vegetais como substrato.

O aumento da temperatura, tal como o aumento da razão molar, provocou a diminuição do teor de ésteres metílicos obtido. A desnaturação das proteínas quando submetidas a uma temperatura superior ao valor ótimo estará na origem desse decréscimo, i.e., apesar de as reações tenderem a ser mais rápidas com o fornecimento de calor, no caso das proteínas ocorre disrupção da sua estrutura terciária quando são sobreaquecidas o que, consequentemente, afeta a sua atividade catalítica. O valor ótimo de temperatura varia de acordo com a proteína. Para a *Thermomyces lanuginosus*, de onde provém a Lipozyme TL IM, este valor estará entre os 30 e os 40°C (Antczak *et al.*, 2009), se bem que dependa bastante da razão molar álcool:óleo utilizada devido à inativação da enzima.

Apesar da análise estatística excluir as interações entre as variáveis independentes como relevantes na produção dos ésteres metílicos, as figuras 3.4 a 3.9 apresentam as variações da

superfície de resposta correspondente ao efeito de duas variáveis, mantendo as restantes num valor fixo (escolheu-se o ponto médio).

Na figura 3.4 observa-se o aumento do teor de ésteres com a adição água. Todavia, para igual aumento da quantidade de metanol, nota-se o decréscimo do teor máximo em ésteres, sendo que para a razão de 15:1, o aumento no teor de água de 18 para 24% não impediu um ligeiro decréscimo no teor de ésteres, de 43,9 para 43,3%. Isto será o reflexo, pressupõe-se, da inativação da enzima devido à polaridade do meio. Para uma razão molar igual a 3:1, um mínimo de 18% de água permite atingir os 100% de produção de ésteres metílicos, enquanto para uma razão molar de 6:1, 24% de água corresponde também a 100% de ésteres. Não se adicionando água, só ocorre conversão em ésteres metílicos para razões molares inferiores a 9:1, mas neste caso a conversão é inferior a 10%.

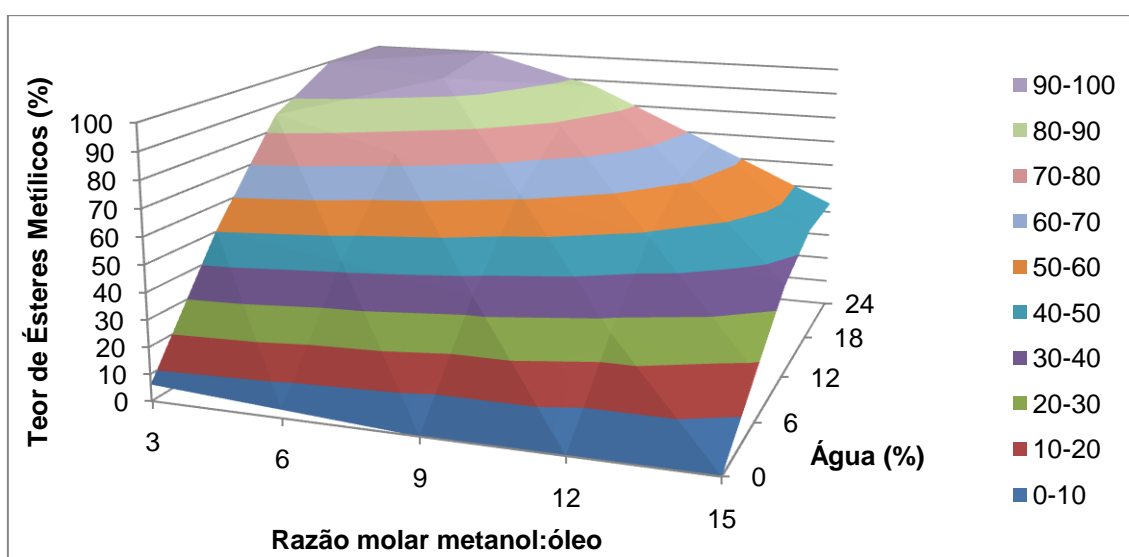


Figura 3.4. Efeito da percentagem de água e da razão molar metanol:óleo no teor de ésteres metílicos, para uma temperatura de 35°C e 96,8 g de lipase pura.

Na figura 3.5. observa-se o aumento do teor de ésteres com o aumento da quantidade de água, independentemente da temperatura. Quanto maior o teor de água, menor parece ser o efeito das diferenças de temperatura no intervalo entre os 20 e os 50°C. Exemplificando, para 24% de água a diferença do teor de ésteres expectável para os 20 e os 42,5°C é apenas de 10%. Sem adição de água só há conversão para uma temperatura inferior a 35°C. Estes resultados deixam entender que o efeito da temperatura poderá ser ligeiramente mitigado pela adição de maior quantidade de água.

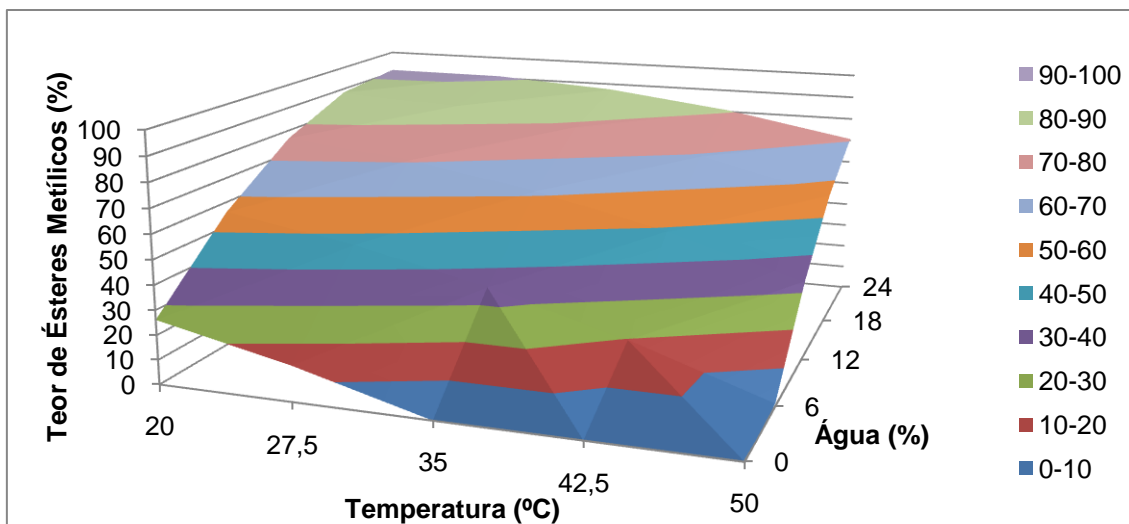


Figura 3.5. Efeito da percentagem de água e da temperatura no teor de ésteres metílicos, para uma razão molar metanol:óleo de 9:1 e 96,8 g de lipase pura.

Na figura 3.6., o teor mais elevado em ésteres corresponde ao expectável, ou seja, à conjugação da menor razão molar e menor temperatura, cujos efeitos lineares foram previamente discutidos. O aumento da temperatura, para uma razão molar de 3:1, provoca uma queda abrupta no teor de ésteres metílicos, sendo o mesmo verdadeiro para o aumento da razão molar a uma temperatura de 20°C – para RM igual a 15:1 o teor de ésteres metílicos não ultrapassa os 38%, enquanto para 50°C de temperatura este valor é sempre inferior a 43%.

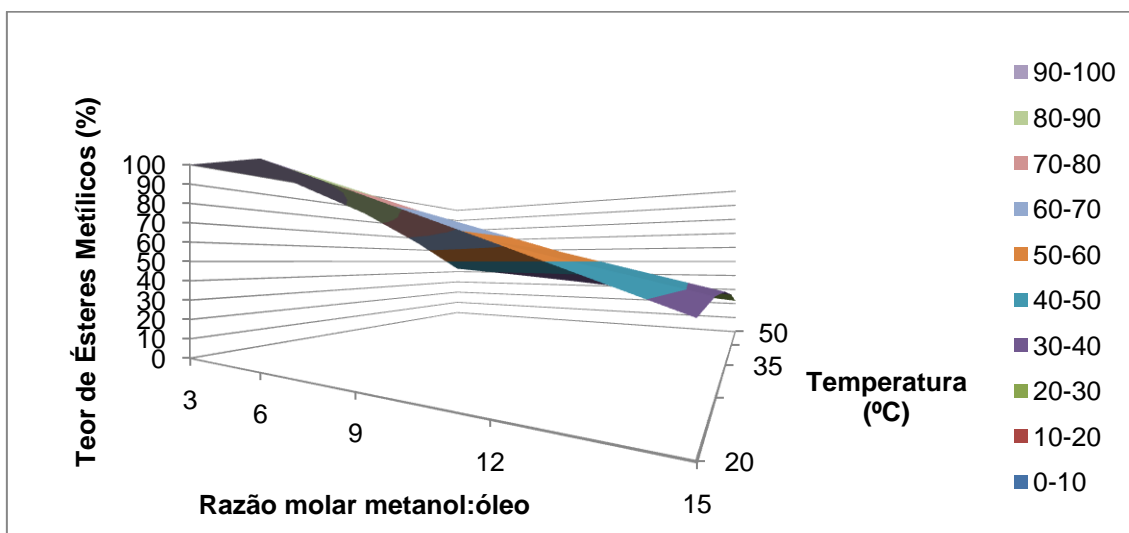


Figura 3.6. Efeito da temperatura e da razão molar metanol:óleo no teor de ésteres metílicos, para 96,8 g de lipase e 12% de água.

A figura 3.7. apresenta a superfície de resposta para conjugações de valores de lipase pura e água. Nota-se que para baixas percentagens de água os teores de conversão são maiores para a menor quantidade de lipase pura adicionada. No entanto, à medida que aumenta a percentagem de água, o teor de ésteres passa a ser maior com o aumento da quantidade de lipase.

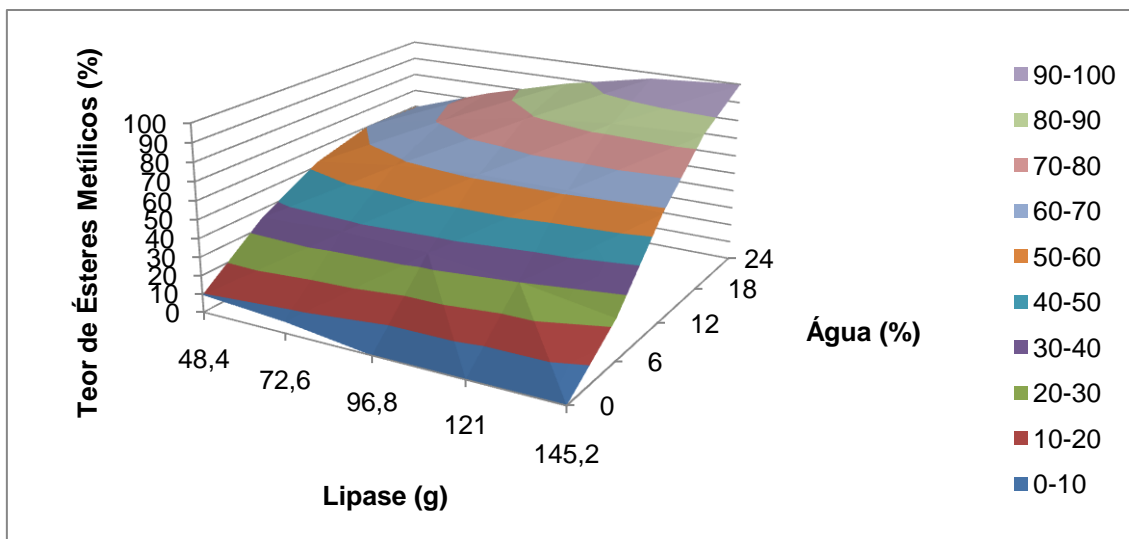


Figura 3.7. Efeito da percentagem de água e da quantidade de lipase pura no teor de ésteres metílicos, para razão molar metanol:óleo de 9:1 e 35°C de temperatura.

É provável que isto aconteça devido à existência de uma concentração ótima de água para a lipase. Assim, abaixo da concentração ótima, o excesso de lipase presente irá fazer com que seja mais difícil a exposição dos centros ativos ao substrato, além de poder ocorrer a agregação das moléculas de enzima (Kumari *et al.*, 2009), o que iria diminuir a conversão em ésteres. No caso da concentração de água para a lipase ser bastante superior ao ótimo, o efeito inibitório da água far-se-ia sentir: 48,4 g de lipase pura correspondem a um máximo de 60,4% de conversão em ésteres no caso de se ter adicionado 18% de água, sendo que o teor de ésteres diminui para 59,4%, no caso da adição de 24% de água ao sistema.

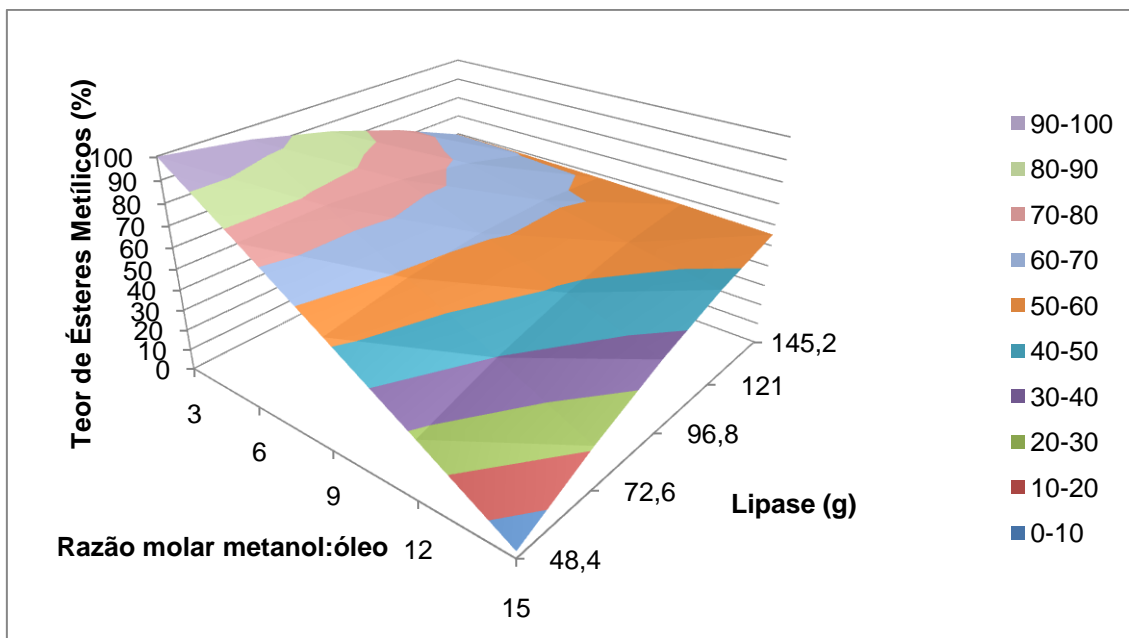


Figura 3.8. Efeito da quantidade de lipase pura e da razão molar metanol:óleo, para 35°C de temperatura e 12% de água.

Na figura 3.8 verifica-se que, para valores muito elevados de lipase, a alteração da razão molar metanol:óleo pouca influência tem no teor de ésteres metílicos: para 145,2 g de lipase corresponde um teor de ésteres que varia entre 55 e 59%, para uma razão molar de 15:1 e 3:1, respetivamente. A diminuição da quantidade de lipase corresponde ao aumento do teor de ésteres no caso de razão metanol:óleo inferior a 9:1, e a um decréscimo do teor de ésteres, no caso de razão metanol:óleo superior a 9:1. É crível que haja aqui uma relação entre o excesso de enzima no meio, quando se adiciona menos álcool reacional, e o efeito inibitório causado pelo metanol em excesso, havendo um ponto de inversão, correspondendo à maior ou menor preponderância de uma das variáveis.

A figura 3.9, apresenta a superfície de resposta para a variação do teor de ésteres metílicos devido à conjugação da quantidade de lipase e da temperatura. Os maiores teores de ésteres obtêm-se para 20°C de temperatura e 145,8 g de lipase pura, sendo atingido o valor de 91,8% de conversão. Para uma baixa quantidade de lipase adicionada, é reduzida a variação do teor de ésteres independentemente da temperatura. Para maiores quantidades de lipase, é evidente o efeito da desnaturação das proteínas para temperaturas elevadas, resultando num valor diminuto da conversão em ésteres. O oposto acontece quando a maior quantidade de proteína corresponde temperaturas mais baixas.

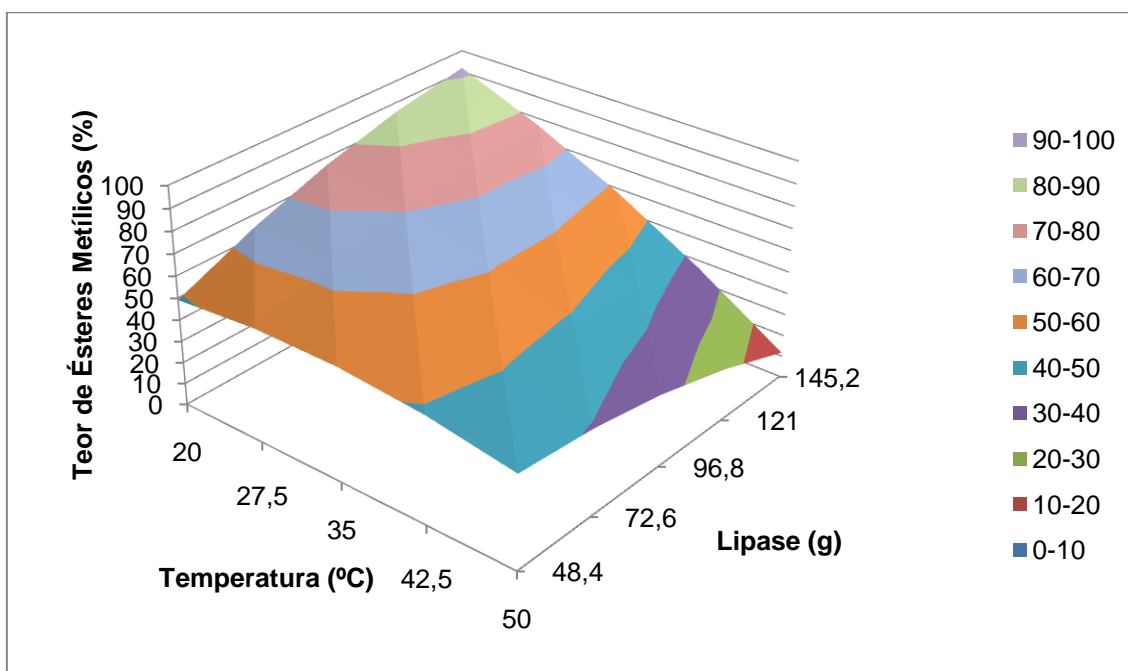


Figura 3.9. Efeito da quantidade de lipase pura e da temperatura no teor de ésteres metílicos, para valores de razão molar metanol:óleo de 9:1 e 12% de água.

3.3.2. Condições ótimas – determinação e validação

Após a análise dos efeitos das variáveis independentes sobre o teor de ésteres metílicos, era necessário determinar quais as condições de ensaio que permitiram a obtenção da maior

percentagem possível de ésteres metílicos, de modo a superar os 96,5% estabelecidos na norma EN 14214.

Inicialmente pretendia-se utilizar as condições ótimas determinadas pelo programa “Statistica 8”. Porém, tal não foi possível visto que o programa fornecia valores negativos. Este comportamento é explicado pelo facto de não se observarem máximos nas superfícies de resposta obtidas, significando que os intervalos seleccionados para o estudo das diferentes variáveis não foram os mais adequados.

Recorreu-se, então, ao programa “Mathematica 5” que, baseado num algoritmo de otimização, indicou as condições que poderiam permitir a obtenção de um teor de ésteres metílicos de 100% (quadro 3.22).

Os valores indicados para temperatura, razão molar metanol:óleo e água correspondem ao limite superior do intervalo estudado (no caso da água) e ao limite inferior (no caso da temperatura e da razão molar), o que está na linha do que se tinha concluído no ponto anterior, quando se abordou o efeito linear destes 3 parâmetros. O valor encontrado para a quantidade de lipase, tendo em conta que o efeito da variação da mesma foi determinado como sendo estatisticamente pouco significativo, pode ter derivado da relação que se fez notar em relação à concentração da mesma na água, sendo este o fator mais importante na variação do teor de ésteres.

Realizou-se, então, um ensaio de transesterificação enzimática, nas condições referidas (quadro 3.22.), com a duração de 18 horas, tendo sido utilizado o óleo “S10”, submetido ao processo de degomagem, tal como havia sucedido nos ensaios anteriores. Embora o teor de ésteres metílicos resultante da equação analítica fosse de 100%, constatou-se que experimentalmente se obtinha somente 68,0% de ésteres metílicos, valor bastante abaixo do expectável.

Quadro 3.22. Condições reacionais ótimas, conforme definidas pelo “Mathematica 5”, sob as quais foi efetuado o ensaio para obtenção do teor máximo de ésteres metílicos.

Condições reacionais	Teor de ésteres metílicos obtido (%)
Temperatura – 20°C	68,0
Razão molar metanol:óleo – 3:1	
Quantidade de Lipase pura – 145,2 mg	
Quantidade de água – 24 % (m/m)	

Este resultado confirma o que foi discutido anteriormente, acerca da inadequação dos intervalos estudados, nomeadamente para a razão molar metanol:óleo, a percentagem de água e a temperatura.

Atendendo à inadequação das condições determinadas pelos programas informáticos, optou-se por analisar os teores de ésteres obtidos e os teóricos e considerar um dos ensaios como reunindo as condições ótimas.

De acordo com o quadro 3.20., as melhores condições reacionais correspondem ao ensaio 13, onde seria expectável 100% de ésteres metílicos, pese embora se tenha obtido 95,5% no ensaio efetuado. No ensaio 9 obteve-se o teor mais elevado em ésteres, conquanto o teor expectável fosse ligeiramente inferior ao do ensaio 13 (99,2%). Dois dos outros ensaios (ensaios 17 e 24) revelaram um teor real superior a 95%, apesar do teor esperado ser inferior a esse valor.

Na escolha do ensaio com as condições ideais é importante lembrar que o custo da enzima é o principal fator limitante do uso da transesterificação enzimática à escala industrial. Assim sendo, o ensaio 9 antevê-se como sendo o mais promissor dado que, para além de tanto o teor real de ésteres como o esperado estarem acima dos 96,5% estabelecidos na norma EN 14214, a quantidade de lipase utilizada é 40% inferior à utilizada no ensaio 13 e 25% inferior à utilizada nos ensaios 17 e 24.

Sendo o custo energético outro fator a ter em conta na produção de biodiesel, o ensaio 9 reúne as condições ideais para a obtenção de um teor de ésteres superior a 96,5%, com baixos custos para o processo produtivo. As condições selecionadas (ensaio 9) foram validadas através da realização de mais um ensaio de transesterificação, no qual um teor de ésteres metílicos de 97,0% foi obtido ao fim de 18 h de reação (figura 3.10.)

No quadro 3.23, apresentam-se alguns dados comparativos relativos à transesterificação enzimática do óleo de *Jatropha curcas* com recurso a diferentes lipases e com diferentes álcoois/aceitadores-acil. A otimização das condições reacionais, para diferentes lipases, mostra ser necessária uma temperatura superior à determinada neste estudo para a Lipozyme TL IM (*Thermomyces lanuginosus*), o que é importante ter em conta para os aspetos económicos. Somente com a *Pseudomonas cepacia* foi possível obter um teor de ésteres superior ao estipulado pela norma europeia EN 14214, pese embora a quantidade de enzima utilizada tenha sido bastante elevada e a temperatura de 50°C.

Quadro 3.23. Diferentes condições reacionais para a produção de ésteres de ácidos gordos tendo como matéria-prima óleo de *Jatropha curcas*. (Nazir *et al.*, 2009; Kumari *et al.*, 2009; Juan *et al.*, 2011).

Lipase	Quantidade de lipase	Álcool/aceitador acil	Razão molar metanol:óleo ou Quantidade (ml)	Água	Temperatura (°C)	Teor de ésteres (%)
<i>Candida antarctica</i>	10% (m/m óleo)	Acetato de etilo	873	-	50	91,3
<i>Candida antarctica</i>	30% (m/m óleo)	Propan-2-ol	-	-	50	92,8
<i>Pseudomonas cepacia</i>	90g	Etanol	233	5%	50	98
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	6% (m/m óleo)	Metanol	160	-	40	72
<i>Candida antarctica</i>	30% (m/m óleo)	Acetato de metilo	595	4,6%	50	86,1
<i>Candida antarctica</i>	30% (m/m óleo)	Acetato de etilo	735	4,6%	50	87,2
<i>Rhizopus oryzae</i>	54g	Metanol	120	1,5%	30	80,2
<i>Chromobacterium viscosum</i>	-	Etanol	-	-		92,0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	Metanol	4:1	-	55	94
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	7,5% (m/m óleo)	Metanol	5:1	-	45	77

3.3.3. Efeito do tempo de reação

Os ensaios de transesterificação enzimática do estudo da otimização decorreram durante um período de 18 horas, findo o qual se esperava que a reação já tivesse atingido o teor máximo de ésteres metílicos, ou seja, o ponto de equilíbrio, para as condições definidas. Posteriormente, efetuou-se um ensaio nas condições ótimas definidas no ponto anterior, efetuando recolha de amostras de 3 em 3 horas, tendo como intuito verificar a evolução do teor de ésteres ao longo do tempo (figura 3.10).

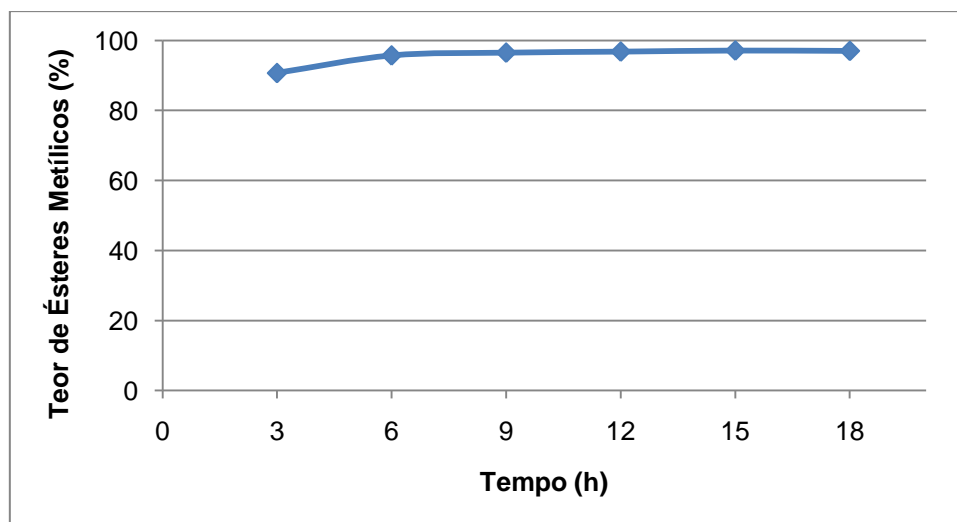


Figura 3.10. Variação do teor de ésteres metílicos ao longo do tempo, para 27,5°C de temperatura, 72,6 g de lipase pura, razão molar metanol:óleo de 6:1 e 18% de água.

Como se pode observar, a conversão em ésteres metílicos decorre a um ritmo elevado, sendo que após 3 horas o teor de ésteres metílicos foi de 90,7%; às 6 horas foi de 95,7%, às 9 atingiu os 96,5%, valor mínimo estabelecido na norma EN 14214, tendo estabilizado nos 97% ao fim de 15 horas.

A possibilidade de obtenção de um elevado teor de ésteres em menos tempo permite que se realizem poupanças a nível energético, o que confere especial importância a estes resultados, que ilustram a possibilidade de efetuar a transesterificação enzimática num tempo bastante inferior às 18 horas inicialmente definidas. Noutros trabalhos verificou-se que a transesterificação com recurso à Lipozyme TL IM atingia o ponto de equilíbrio em apenas 7 horas, tendo como substrato diferentes óleos vegetais (Hernandez-Martin *et al.*, 2008).

3.3.4. Reutilização da lipase

A possibilidade de reutilização da lipase é um aspeto importante a ter em conta dado que pode permitir diminuir o custo da produção de biodiesel e tornar o processo economicamente viável. A reutilização das enzimas é, por vezes, comprometida pela inativação da lipase devido à exposição prolongada ao álcool reacional, quando o mesmo é de cadeia curta (metanol ou etanol) ou pela inibição provocada pelo glicerol (Bajaj *et al.*, 2010). A utilização de propanol como álcool reacional também revela menor inativação da proteína após múltiplas reutilizações do que o metanol (Bajaj *et al.*, 2010). A atividade catalítica da lipase pode igualmente ser afetada pelo processo de filtração e lavagem da lipase com hexano (apolar) ou um álcool de cadeia longa (e.g., butanol) após cada utilização (Kumari *et al.*, 2009).

Neste trabalho reutilizou-se a enzima imobilizada por 5 vezes. Para diminuir a perda de lipase, o que teria grande probabilidade de acontecer devido à formação de uma mistura pastosa, utilizou-se uma estrutura cilíndrica porosa onde ficasse retida a preparação de lipase imobilizada – o tamanho dos poros permitiria a passagem de metanol e óleo, mas iria impedir a saída de lipase (figura 3.11).



Figura 3.11. Estrutura cilíndrica porosa utilizada nos ensaios com a enzima imobilizada.

Não se notou um decréscimo acentuado do teor de ésteres obtido nas várias reutilizações (figura 3.12). Aliás, atendendo ao facto de que não se pôde evitar a perda de alguma quantidade de enzima, e que não se adicionou quantidade que recolocasse o valor nos 72,6 g iniciais, os resultados são auspiciosos quanto à possibilidade de reutilização da Lipozyme TL IM. O facto de os grânulos se terem desfeito também dificultou a filtração para eliminação de

contaminantes, como o glicerol, antes de nova reutilização, embora se tenha procedido sempre à lavagem com água.

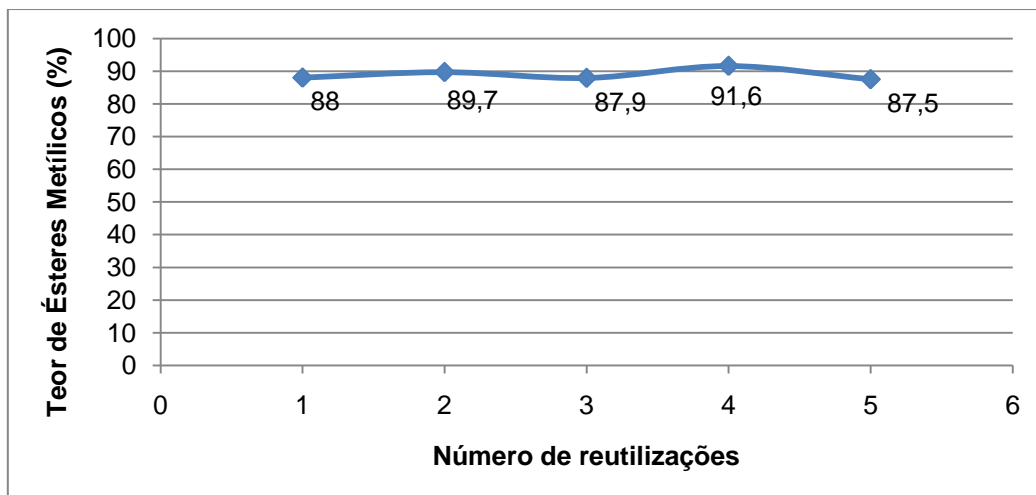


Figura 3.12. Capacidade de reutilização da lipase imobilizada (Lipozyme TL IM) na reação de transesterificação, a 27,5°C de temperatura, razão molar metanol:óleo de 6:1, 72,6 g de lipase e 18% (m/m) de água.

Verificou-se que, após alguma perda de atividade logo na primeira reutilização – o teor de ésteres baixou de 97 para 88% - o teor de ésteres manteve-se constante, podendo as ligeiras oscilações ser explicadas por diferenças decorrentes da filtração da amostra e da eliminação dos produtos da reação. A diminuição do teor de ésteres para 88% na primeira reutilização pode dever-se à agregação da lipase devido à mistura pastosa originada durante a reação inicial ou, como sugerem Nazir *et al.* (2009), num estudo em que foi utilizada uma lipase da *Pseudomona fluorescens*, pode ter ocorrido desadsorção da enzima do suporte de imobilização após o primeiro contato com a mistura reacional, não ocorrendo o mesmo processo após a sua reutilização. Noutros trabalhos, verificou-se elevada estabilidade da lipase de *Thermomyces lanuginosus* ao longo de várias reutilizações com misturas de óleos vegetais (Bajaj *et al.*, 2009).

3.3.5. Utilização de outros óleos de *Jatropha curcas*

A otimização das condições reacionais, como foi atrás referido, foi efetuada para o óleo designado por “S10” - o óleo das sementes de Santiago extraídas com um seletor de pressão com boca de tubulação de 10 mm.

Tendo em conta que uma das vantagens do processo enzimático é a esterificação simultânea dos ácidos gordos livres, interessava utilizar como matéria-prima o óleo extraído das sementes do Fogo, que possuía maior índice de acidez. Por questões relacionadas com a quantidade de óleo disponível, só se produziu biodiesel a partir do óleo “F14”. Também se procedeu ao ensaio com o óleo “S14”, embora neste caso, devido às características iguais ao do “S10”, o teor de ésteres previsto fosse similar.

Os resultados obtidos (quadro 3.24.) permitem concluir que o desempenho da Lipozyme TL IM não é afetado pelo maior índice de acidez de um óleo, pese embora o teor de ésteres metílicos do óleo do Fogo se tenha situado meio ponto percentual abaixo dos 96,5% estabelecidos pela norma EN 14214.

Quadro 3.24. Teor de ésteres metílicos obtido, nas condições ótimas, para os óleos S14 e F14.

Amostra	Teor de Ésteres Metílicos (%)
S14	98,1
F14	96,0

3.3.6. Utilização de outras lipases comerciais

Preponderantes na catálise da generalidade das reações que ocorrem em todos os organismos vivos, desde o Ciclo de Krebs até à transcrição da informação genética, diferentes enzimas possuem diferente especificidade em relação ao substrato e atingem o seu máximo catalítico em diferentes condições do meio envolvente, seja no que concerne à temperatura, polaridade, pH, água, presença ou ausência de inibidores. O mesmo se aplica à transesterificação enzimática de ácidos gordos, tendo cada enzima um ponto ótimo de atuação diferente das outras. Foi com o objetivo de se estudar essas variações que se procedeu a ensaios de transesterificação com duas lipases comerciais adicionais, a Novozym 435 e a Lipozyme 100L. A Novozym 435 (lipase B da *Candida antarctica*) é uma lipase comercial imobilizada em resina acrílica, enquanto a Lipozyme 100L corresponde à mesma lipase que a Lipozyme TL IM, só que na forma solúvel.

Utilizando a metodologia de Lowry, determinou-se o teor proteico das duas lipases (quadro 3.25) com recurso a uma reta de calibração (figura 3.2.), para que fosse possível adicionar a mesma quantidade de lipase pura que nos ensaios com a Lipozyme TL IM.

Quadro 3.25. Teor proteico determinado para a Novozym 435 e Lipozyme 100L.

Lipase comercial	Teor proteico	Quantidade adicionada (incluindo suporte, no caso da Novozym 435)	Quantidade de lipase pura adicionada (mg)
Novozym 435	62,8 mg/g de suporte	1,2 g	72,6
Lipozyme 100L	26,2 mg/ml de suspensão	2,8 ml	72,6

O óleo utilizado foi o “S10” e os teores de ésteres metílicos obtidos estão indicados no quadro 3.26.

Quadro 3.26. Teor de ésteres obtido com as lipases comerciais Novozym 435 e Lipozyme 100L: 27,5°C, razão molar metanol:óleo de 6:1, 72,6 g de lipase pura, 18% de água e 18 horas de reação.

Lipase comercial	Teor de ésteres metílicos (%)
Novozym 435	3,1
Lipozyme 100L	94,1

A elevada conversão registada para a Lipozyme 100L era o resultado expectável, atendendo a que corresponde à mesma enzima que a lipase imobilizada Lipozyme TL IM, a catalisar a reação de um substrato com o mesmo perfil lipídico. A desvantagem da enzima solúvel é a impossibilidade de reutilização da mesma após a reação de transesterificação, o que constitui um obstáculo na redução de custos do processo de produção de biodiesel.

No ensaio com a Novozym 435, o teor de ésteres metílicos foi somente de 3,1%. Sendo esta considerada uma das lipases com maior eficiência na transesterificação de óleos vegetais para produção de biodiesel (Tamalampudi *et al.*, 2008), o que se deve à regiosseletividade não específica da lipase da *Candida antarctica*, i.e., à não distinção da posição das ligações éster a serem clivadas, e a não apresentar especificidade para apenas algumas cadeias de ácidos gordos (Antczak *et al.*, 2009), não é provável que o baixo teor de ésteres derive de baixa afinidade da Novozym 435 para com o óleo de *Jatropha curcas*. Resta considerar as condições reacionais utilizadas e, neste caso, a literatura permite alvitrar algumas possíveis causas, como a inativação da enzima por intermédio da água ou do metanol (Talamanpundi *et al.*, 2008).

Tamalampundi *et al.* (2008) constataram que a obtenção de ésteres metílicos a partir do óleo de *Jatropha curcas*, na presença da Novozym 435, é favorecida num meio anidro, pressupondo-se que esta lipase necessita de quantidades mínimas de água para se manter na conformação ativa, porventura sendo suficiente a quantidade de água presente no óleo. Este comportamento difere significativamente do que se verificou para a Lipozyme TL IM no presente trabalho. Ainda nos estudos de Talamampundi *et al.* (2008), verificou-se que a atividade da Novozym 435 era mais afetada pelo álcool reacional do que outra enzima utilizada como padrão de comparação, a lipase da *Rhizopus oryzae*.

Num outro estudo, um teor de ésteres metílicos de 97,2% foi obtido aquando da transesterificação de óleo de *Jatropha curcas*, utilizando carbonato dietílico como aceitador acil em vez de um álcool de cadeia curta, como o metanol (Su *et al.*, 2011). O uso de carbonato dietílico para a transesterificação por intermédio de Lipozyme TL IM resultou numa percentagem de conversão de apenas 2,1% (Su *et al.*, 2011), o que reforça a noção de que as condições reacionais para as duas lipases comerciais em comparação tendem a ser significativamente distintas.

3.3.6.1. Imobilização da lipase solúvel

A imobilização da lipase comercial solúvel Lipozyme 100L efetuou-se conforme o método descrito em 2.8.

A determinação do teor proteico foi realizada tanto para a preparação enzimática onde se adicionou 2,8 ml de Lipozyme 100L (A) como para a preparação enzimática que continha 4 ml de Lipozyme 100L (B).

Para a preparação com o volume mais baixo de enzima, o teor proteico correspondeu a 24,4 mg/g de suporte, enquanto para a preparação em que se adicionou 4,0 ml, o teor proteico foi igual a 25,6 mg/g de suporte (valores calculados com base na reta de calibração $y = 0,0014x + 0,0191$, com um coeficiente de determinação de 0,9909). Estes valores ilustram que, apesar da preparação B conter mais 43% de enzima solúvel do que a preparação A, para igual quantidade de suporte de poliamida (750 mg), a diferença no teor proteico é inferior aos 5%. O suporte terá um valor máximo de lipase que consegue adsorver, a partir do qual a adição de maiores quantidades de lipase solúvel tem pouco efeito sobre o valor do teor proteico. Ponderando os custos de operação, para a obtenção de grandes quantidades de lipase imobilizada em poliamida EP700, optou-se por realizar o ensaio de transesterificação com a enzima imobilizada na proporção de 2,8 ml de enzima solúvel para 750 mg de suporte. Neste caso, o rendimento de imobilização, por comparação com o teor proteico da Lipozyme TL IM (96,8 mg/g de suporte), foi de 25,2%.

A conversão do óleo de *Jatropha curcas* (S10), utilizando a lipase imobilizada em laboratório, foi realizada nas condições ótimas definidas para a Lipozyme TL IM (secção 3.3.2.), durante 18 horas, e uma quantidade de lipase pura de 72,6 mg (quadro 3.27).

Quadro 3.27. Teor proteico determinado para a Lipozyme 100L adsorvida no suporte de poliamida, quantidade de enzima utilizada na transesterificação e teor de ésteres obtido.

Enzima	Teor Proteico (mg/g suporte)	Suporte com enzima adsorvida (g)	Lipase pura (g)	Teor de ésteres metílicos (%)
Lipozyme 100L imobilizada	24,4	2,9756	72,6	59,5

O objetivo da imobilização da Lipozyme 100L era eliminar o constrangimento provocado pela impossibilidade de reutilização da enzima solúvel, além do facto das enzimas imobilizadas apresentarem maior estabilidade em relação à temperatura, sendo menos propensas à desnaturação. Neste caso, seria expectável que o teor de ésteres metílicos se assemelhasse ao obtido para a Lipozyme TL IM ou para a Lipozyme 100L, i.e., estivesse acima dos 90%, o que não se verificou. O comportamento observado com a lipase imobilizada no suporte de poliamida pode estar relacionado com o facto deste tipo de suporte causar uma maior limitação à transferência de massa interna e externa de substratos e produtos, por comparação com outros suportes comercializados, não permitindo que a reação de transesterificação fosse completa. Sugere-se, ainda, a possibilidade de que a quantidade de suporte presente na

mistura reacional, aproximadamente 3 g, possa ter dificultado o contato entre o substrato e a lipase, diminuindo assim o teor de ésteres metílicos obtido.

3.4. Caracterização do biocombustível

Ao longo do trabalho realizado, os biocombustíveis obtidos a partir dos vários óleos de *Jatropha* foram apenas caracterizados num dos parâmetros da norma EN 14214 – ésteres metílicos. De modo a avaliar a eficiência do processo de purificação (descrito em 2.10.1), o produto obtido foi analisado em termos de ponto de inflamação e de teor de água, de metanol e de glicerol livre. A determinação do teor de mono, di e triglicéridos foi também efetuada para alguns dos produtos, de modo a avaliar se a reação de transesterificação tinha sido completa.

3.4.1. Teor de mono, di e triglicéridos, glicerol livre e total

O teor de mono, di e triglicéridos, glicerol livre e total foi determinado, conforme o método descrito 2.6.8.4., para os ensaios com óleo “S10” cujo teor de ésteres foi superior a 90% (quadro 3.16.), e para o produto obtido na transesterificação do óleo “S14”, produzido em maior quantidade para efeitos de caracterização. Os resultados estão expressos no quadro 3.28.

Quadro 3.28. Percentagem de mono, di e triglicéridos, glicerol livre e glicerol total para amostras de biodiesel.

Amostra	Monoglicéridos (% m/m)	Diglicéridos (% m/m)	Triglicéridos (% m/m)	Glicerol livre (% m/m)	Glicerol total (% m/m)
9	0,27	0,04	0,00	0,01	0,09
10	0,28	0,04	0,02	0,00	0,08
13	0,29	0,09	0,02	0,00	0,09
14	0,35	0,03	0,04	0,00	0,10
17	0,17	0,06	0,01	0,01	0,06
24	0,21	0,04	0,04	0,02	0,08
S14	0,22	0,06	0,00	0,00	0,07

Em todas as amostras os valores dos parâmetros determinados não excederam os estabelecidos na norma EN 14214 (0,80% para mono, 0,20% para di, 0,20% para triglicéridos, 0,02% para glicerol livre e 0,25% para glicerol total), o que é uma das características de um biodiesel de boa qualidade, indicador de que a transesterificação não foi incompleta. Os baixos teores de glicerol livre são indicativos de que o processo de purificação foi eficiente na remoção de algum glicerol que pudesse estar presente no biodiesel, ainda que em quantidade diminuta.

3.4.2. Ponto de inflamação, teor de água e metanol

O ponto de inflamação e os teores de água e metanol (quadro 3.29.) foram determinados para o biocombustível obtido a partir da transesterificação de 100 g do óleo “S14”, conforme os métodos descritos nas secções 2.6.7., 2.6.6. e 2.7.4, respetivamente.

Quadro 3.29. Caracterização do biocombustível de *Jatropha curcas* para os parâmetros ponto de inflamação, teor de água e teor de metanol.

Amostra	Ponto de Inflamação (°C)	Teor de água (ppm)	Teor de metanol (% m/m)
S14	>140	483	<0,01

Para a deteção do ponto de inflamação, o biodiesel foi progressivamente submetido a temperaturas de 70, 100, 120 e 140°C, sem que tenha havido inflamação. A norma EN 14214 estipula os 101°C como a temperatura mínima do ponto de inflamação para um biodiesel de qualidade, o que coloca este biocombustível de purgueira nesse patamar. O elevado valor para este parâmetro está associado à baixa presença de metanol no biocombustível em análise.

O processo de secagem revelou-se fulcral para que o teor de água do biodiesel fosse inferior aos 500 ppm fixados pela norma EN 14214 – verificou-se que a secagem no evaporador rotativo se mostrou mais eficaz do que o mais rudimentar método de passar o produto por sulfato de sódio anidro, método este, aliás, sem grandes possibilidades de aplicação a nível industrial. Após secagem com sulfato de sódio anidro verificou-se um teor de água de cerca de 1000 ppm, tendo o valor sido reduzido para os 483 ppm (quadro 3.29), após secagem no evaporador rotativo.

Também o teor de metanol cumpre a norma EN 14214, que estipula um valor máximo de 0,2% (m/m), o que está associado ao facto de ter ocorrido uma eficiente evaporação/secagem do combustível.

4. Conclusões

Neste trabalho realizou-se a produção de biodiesel a partir do óleo de sementes de diferentes variedades de *Jatropha curcas* provenientes de Cabo Verde. Utilizaram-se sementes das ilhas de Santiago e do Fogo, tendo sido analisados lotes importados em abril e em agosto de 2010. A extração do óleo foi efetuada por soxhlet, com utilização de um solvente, e por intermédio de uma prensa mecânica, constituída por um parafuso sem-fim ao qual foi adaptado, em dois ensaios separados, dois seletores de pressão com bocas de tubulação de 10 e 14 mm. Na extração com solvente, o teor de óleo mais elevado foi registado para a amêndoa das sementes de Santiago, sendo igual a 53,7% (m/m). Por seu turno, a amêndoa das sementes do Fogo possuía um teor de óleo de 46,6% (m/m). Na extração com prensa mecânica obteve-se um teor de óleo, extraído diretamente das sementes com casca, de cerca de 15% (m/m) quando se utilizou o seletor de pressão de 14 mm, e de 19% (m/m) quando se utilizou o seletor de pressão de 10 mm. O teor total de óleo nas sementes com casca, contabilizando o óleo presente no bagaço, foi de cerca de 30%, valor que coincidiu com o obtido na extração com solvente para as sementes com casca. Fica evidente que, embora a prensa mecânica tenha permitido a extração de óleo a partir de uma maior quantidade de matéria-prima, o processo de extração tem de ser otimizado para que se evite a perda de 30 a 50% do óleo presente na semente.

Os óleos extraídos foram caracterizados em diversos parâmetros que afetam a produção de biodiesel e a qualidade do mesmo, tais como o índice de acidez, o índice de iodo e a composição em ácidos gordos.

No que diz respeito ao índice de iodo, todas as amostras analisadas revelaram um valor inferior ao limite máximo especificado para o biodiesel (120 g I₂/100 g), o que abona a favor da utilização dos óleos de *Jatropha* como matéria-prima para a produção deste biocombustível. Os valores obtidos são indicativos do grau de insaturação do óleo e, consequentemente, da sua estabilidade.

A composição em ácidos gordos permitiu classificar estes óleos como sendo do tipo oleico-linoleico, devido à predominância destes ácidos gordos. Todavia, tanto para os lotes de Santiago como para os lotes do Fogo houve variância no perfil de ácidos gordos, o que deve ser consequência da influência do meio nas características da planta. Variáveis como a época da colheita, o tipo de solo ou a região serão importantes na composição do óleo, o que tornaria benéfico a caracterização de culturas de *Jatropha curcas* provenientes de diferentes zonas dentro de determinada ilha, por contraponto com a mera caracterização de culturas de ilhas diferentes.

O índice de acidez foi mais elevado para as sementes da ilha do Fogo, o que se verificou tanto para o lote de abril, como para o lote de agosto. Sendo o índice de acidez uma das principais condicionantes da transesterificação via catálise básica, devido à formação de sabões e consequente diminuição do rendimento mássico, o custo da produção de biodiesel, utilizando o óleo de sementes da ilha do Fogo, seria mais elevado devido à necessidade de pré-tratamento. O menor índice de acidez dos óleos das sementes de Santiago, associado ao maior teor de

óleo nestas sementes, faz crer que este seria o mais indicado para a produção de biodiesel, sobretudo se se optasse pela transesterificação básica.

A transesterificação por via alcalina foi realizada em condições otimizadas em trabalhos anteriores, visando-se a validação dessas condições para a transesterificação de óleos das variedades de *Jatropha curcas* utilizadas, assim como a avaliação da eficácia dos métodos de pré-tratamento (degomagem, neutralização e catálise ácida) do óleo. Para esses ensaios utilizou-se o óleo das sementes do Fogo, devido ao seu maior índice de acidez, e como condições reacionais uma temperatura de 55°C, uma razão molar metanol:óleo de 6:1 e 1% (m/m) de hidróxido de sódio. Ao fim de 3 horas de reação, obteve-se um teor de ésteres superior aos 96,5% definidos pela norma EN 14214, o que confirmou que as condições utilizadas eram adequadas para estes óleos e permitiu validar os métodos de pré-tratamento utilizados.

Na transesterificação via catálise enzimática, utilizou-se a lipase comercial Lipozyme TL IM. A otimização do processo produtivo fez-se mediante a metodologia das superfícies de resposta. Construiu-se um desenho composto central com 4 variáveis, nomeadamente, a temperatura, a razão molar metanol:óleo, a percentagem de água e a quantidade de lipase. A análise estatística dos resultados permitiu concluir que a percentagem de água era o parâmetro que mais influenciava o teor de ésteres metílicos obtido, sendo que a um aumento da percentagem de água adicionada à mistura reacional correspondia um maior teor de ésteres metílicos. A razão molar metanol:óleo e a temperatura mostraram também ter alguma influência embora, neste caso, o seu aumento tenha provocado uma diminuição no teor de ésteres. A quantidade de lipase não teve influência significativa no teor de ésteres metílicos obtido, o que é um fator importante atendendo à relevância que o custo do catalisador tem para o processo produtivo.

Procedeu-se à determinação das condições reacionais mais favoráveis para a reação enzimática, que levariam ao teor mais elevado de ésteres metílicos, tendo em consideração as principais condicionantes económicas do processo produtivo - a energia necessária e a quantidade de catalisador. Assim, o teor de ésteres metílicos mais elevado (97,4%) foi obtido, experimentalmente, para uma temperatura de 27,5°C, uma razão molar metanol:óleo de 6:1, 72,6 g de lipase e 18% de água (m/m), correspondendo a um valor teórico de 99,2% (m/m).

O biocombustível obtido foi também caracterizado noutros parâmetros, como forma de se avaliar a sua qualidade. Os requisitos da norma EN 14214 foram cumpridos, nomeadamente, os teores de mono, di e triglicéridos, de glicerol livre, de glicerol total, de metanol e de água, assim como o ponto de inflamação.

A possibilidade de reutilização da Lipozyme TL IM foi avaliada, tendo-se verificado, após 5 reutilizações, uma diminuição inferior a 10% do teor de ésteres metílicos obtido, apesar da perda de massa de catalisador.

Em suma, a transesterificação enzimática dos óleos de variedades cabo-verdianas de *Jatropha curcas*, utilizando a lipase comercial Lipozyme TL IM, mostrou ser uma alternativa atrativa para a produção de biodiesel. A baixa temperatura de reação exigida, a possibilidade de uso de diminuta quantidade de catalisador e a reutilização da lipase, sem que o teor de ésteres

metálicos deixe de ser elevado, podem permitir a redução do preço do produto final, tornando-o competitivo com o biodiesel produzido através de outros processos.

5. Referências bibliográficas

- Achten, W., Nielsen, L., Aerts, R., Lengkeek, A., Kjaer, E., Trabucco, A., Hansen, J., Maes, W., Graudal, L., Akinnifesi, F., Muys, B. (2010) Towards domestication of *Jatropha curcas*. *Biofuels*, 1, 91-107.
- Akbar, E., Yaakob, Z., Kamarudin, S., Ismail, M., Salimon, J. (2009) Characteristic and Composition of *Jatropha curcas* oil seed from Malaysia and its potential as Biodiesel feedstock. *European Journal of Scientific Research*, 29 (3), 396-403.
- Antczak, M., Kubiak, A., Antczak, T., Bielecki, S. (2009) Enzymatic biodiesel synthesis – Key factors affecting efficiency of the process. *Renewable Energy*, 34, 1185-1194.
- Araújo, F., Moura, C., Chaves, M. (2007) Caracterização do Óleo e Biodiesel de Pinhão-Mansô (*Jatropha curcas* L.). 2º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel, Brasília, Brasil, 1-6.
- Bajaj, A., Lohan, P., Jha, P., Mehrotra, R. (2010) Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 62, 9-14.
- Ban, K., Hama, S., Nishizuka, K., Kaieda, M., Matsumoto, T., Kondo, A., Noda, H., Fukuda, H. (2002) Repeated use of whole-cell biocatalysts immobilized within biomass support particles for biodiesel fuel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 17, 157-165.
- Beerens, P. (2009) *Jatropha Handbook – Oil Pressing and Purification*. FACT Foundation Publications, 2nd edition, Eindhoven, 16 pp.
- British Petroleum (2011) BP Statistical Review of World Energy June 2011. 49 pp.
- Carvalho, C., Clarindo, W., Praça, M., Araújo, F., Carels, N. (2008) Genome size, base composition and kariotype of *Jatropha curcas* L., an important biofuel plant. *Plant Science*, 174, 613-617.
- Castro, M., Friego-Capote, F. (2010) Soxhlet Extraxtion: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*, 1217, 2383-2389.
- Chen, B., Landsman-Roos, N., Naughton, R., Olenyik, K. (2008) *Jatropha curcas* L.: Biodiesel solution or all hype? A scientific, economic and political analysis of the future energy crop. *Energy and Energy Policy*.
- Choi, J., Kim, D., Park, J., Rhee, Y., Lee, J. (2008) Optimization of Esterification of *Jatropha* oil by Amberlyst-15 and Biodiesel Production. *Korean Chem. Eng. Res.*, 46 (1), 194-199.
- Correia, M. (2009) *Avaliação do potencial de Jatropha curcas L. para produção de biodiesel (Santiago – Cabo Verde)*. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Agrónómica, ISA-UTL, 72 pp.
- Croezen, H., Bergsma, G., Otten, M., Valkengoed, M. (2010) *Biofuels: indirect land use change and climate impact*. Report CE Delft, Delft, 62 pp.
- Demirbas, A. (2005) Biodiesel production from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical methanol transesterification methods. *Progress in Energy and Combustion Science*, 31, 466-487.
- Direção Nacional do Planeamento – Ministério das Finanças (2010) *Relatório Global de Seguimento da Execução da Estratégia de Crescimento e de Redução da Pobreza DECRP II*. International Monetary Fund, Publication Services, Washington, D.C., 65 pp.
- Divakara, B., Upadhyaya, H., Wani, S., Gowda, C. (2010) Biology and genetic improvement of *Jatropha curcas* L.: A review. *Applied Energy*, 87, 732-742.
- Farmani, J., Hamed, M., Safari, M., Madadlou, A. (2007) Trans-free Iranian vanaspati through enzymatic and chemical transesterification of triple blends of fully hydrogenated soybean, rapeseed and sunflower oils. *Food Chemistry*, 102, 827-833.

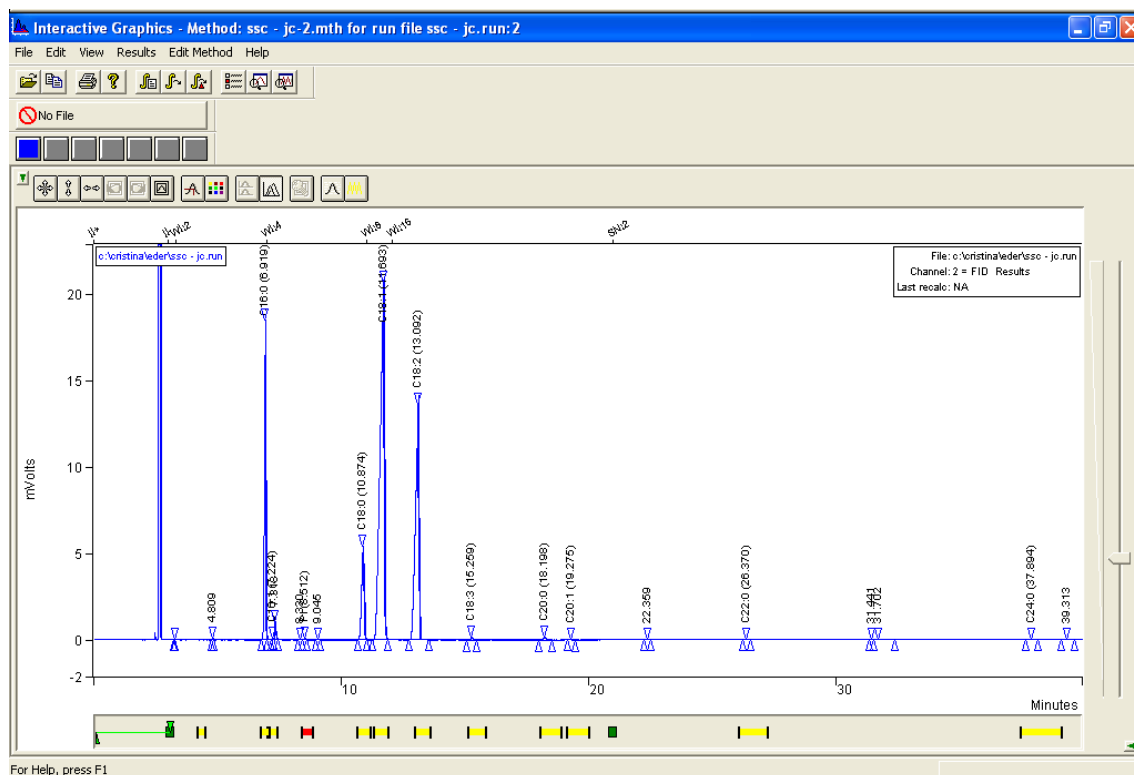
- Furtado, J. (2007) A Purgueira (*Jatropha curcas* L.) em Cabo Verde: Aspectos Agronómicos e suas potencialidades; *Fórum Parlamentar "Segurança Energética, Energias Renováveis e Desenvolvimento"*, Praia, Cabo Verde.
- Garnayak, D., Pradhan, R., Naik S., Bhatnagar, N. (2008) Moisture-dependent physical properties of jatropha seed (*Jatropha curcas* L.). *Industrial Crops and Products*, 27, 123-129.
- Gubitz, G., Mittelbach, M., Trabi, M. (1999) Exploitation of the tropical oil seed plant *Jatropha curcas* L. *Bioresource Technology*, 67, 73-82.
- Heller, J. (1996) *Physic nut. Jatropha curcas* L. *Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops*. 1. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben / International Plant Genetic Resources Institute, Roma, 66 pp.
- Hernández-Martín, E., Otero, C. (2008) Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym® 435 and Lipzyme® TL IM. *Bioresource Technology*, 99, 277-286.
- Huang, J., Sathivel, S. (2010) Purifying salmon oil using adsorption, neutralization, and a combined neutralization and adsorption process. *Journal of Food Engineering*, 96, 51-58.
- Juan, J., Kartika, D., Wu, T., Hin, T. (2011) Biodiesel production from jatropha oil by catalytic and non-catalytic approaches: An overview. *Bioresource Technology*, 102, 452-460.
- Karaj, S., Muller, J. (2011) Optimizing mechanical oil extraction of *Jatropha curcas* L. seeds with respect to press capacity, oil recovery and energy efficiency. *Industrial Crops and Products*, 34, 1010-1016.
- Khor, G., Sim, J., Kamaruddin, A., Uzir, M. (2010) Thermodynamics and inhibition studies of lipzyme TL IM in biodiesel production via enzymatic transesterification. *Bioresource Technology*, 101, 6558-6561.
- Knothe, G. (2005) Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel Processing Technology*, 86, 1059-1070.
- Knothe, G. (2007) Some aspects of biodiesel oxidative stability. *Fuel Processing Technology*, 88, 669-677.
- Knothe, G., Gerpen, J., Krahl, J. (2005) *The Biodiesel Handbook*. AOCS Press, Champaign, Illinois, 286 pp.
- Kumari, A., Mahapatra, P., Garlapati, V., Banerjee, R. (2009) Enzymatic transesterification of *Jatropha* oil. *Biotechnology for Biofuels*, 2 (1).
- Lam, M., Lee, K., Mohamed, A. (2010) Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: A review. *Biotechnology Advances*, 28, 500-518.
- Leal, R., Borges, P., Seidl, P. (2008) Methodological Evaluation of Titration Techniques for the Determination of Iodine Value in Biodiesel. *International Conference on Metrology of Environmental, Food and Nutritional Measurements*, Budapest, Hungria.
- Leung, D., Wu, X., Leung, M. (2010) A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. *Applied Energy*, 87, 1083-1095.
- Lu, H., Liu, Y., Zhou, H., Yang, Y., Chen, M., Liang, B. (2009) Production of biodiesel from *Jatropha curcas* L. oil. *Computers and Chemical Engineering*, 33, 1091-1096.
- Ministério da Economia, Crescimento e Competitividade (2008) *Política Energética de Cabo Verde*, 24 pp.
- Misra, R., Murthy, M. (2010) Straight vegetable oils usage in a compression ignition engine – A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, 3005-3013.

- Moser, B. (2011) Influence of extended storage on fuel properties of methyl esters prepared from canola, palm, soybean and sunflower oils. *Renewable Energy*, 36, 1221-1226.
- Nazir, N., Ramli, N., Mangunwidjaja, D., Hambali, E., Setyaningsih, D., Yuliani, S., Yarmo, M., Salimon, J. (2009) Extraction, transesterification and process control in biodiesel production from *Jatropha curcas*. *European Journal of Lipid Science Technology*, 111, 1185-1200.
- Oliveira, J., Leita, P., Souza, L., Mello, V., Silva, E., Rubim, J., Meneghetti, S., Suarez, P. (2009) Characteristics and composition of *Jatropha gossypifolia* and *Jatropha curcas* L. oils and application for biodiesel production. *Biomass and Bioenergy*, 33, 449-453.
- Owusu-Apenten, R. (2002) *Food Protein Analysis: Quantitative Effects on Processing*. CRC Press, Pennsylvania, 488 pp.
- Parawira, W. (2010) Biodiesel production from *Jatropha curcas*: A review. *Scientific Research and Essays*, 5 (14), 1796-1808.
- Parente, E. (2003) *Biodiesel: Uma Aventura Tecnológica num País Engraçado*. Fortaleza: Tecbio, Fortaleza, 66 pp.
- Pradhan, R., Mishra, S., Naik, S., Bhatnagar, N., Vijay, V. (2011) Oil expression from *Jatropha* seeds using a screw press expeller. *Biosystems Engineering*, 109, 158-166.
- Prueksakorn, K., Gheewala, S. (2006) Energy and Greenhouse Gas Implications of Biodiesel Production from *Jatropha curcas* L. *The 2nd Joint International Conference on "Sustainable Energy and Environment"*, Banquecoque, Tailândia.
- Puhan, S., Saravanan, N., Nagarajan, G., Vedaraman, N. (2010) Effect of biodiesel unsaturated fatty acid on combustion characteristics of a DI compression ignition engine. *Biomass and Bioenergy*, 34, 1079-1088.
- Rodrigues, R., Volpato, G., Ayub, M., Keiko, W. (2008) Lipase-catalyzed ethanolysis of soybean oil in a solvent-free system using central composite design and response surface methodology. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 83, 849-854.
- Sarin, R., Sharma, M., Sinharay, S., Malhotra, R. (2007) *Jatropha*-Palm biodiesel blends: An optimum mix for Asia. *Fuel*, 86, 1365-1371.
- Simas, A. (2008) *Produção de biodiesel a partir de óleos vegetais virgens e usados, comparando transesterificação básica e enzimática*. Dissertação para obtenção de Grau de Mestre em Bioenergia, FCT-UNL, 126 pp.
- Simas, A., Oliveira, A., Lapa, N. (2009) Optimization of enzymatic transesterification of rapeseed oil using the response surface methodology. *17th European Biomass Conference*, Hamburgo, Alemanha.
- Su, E., Du, L., Gong, X. (2011) Lipase-Catalyzed Irreversible Transesterification of *Jatropha curcas* L. Seed Oil to Fatty Acid Esters: An Optimization Study. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 88, 793-800.
- Svensson, J., Adlercreutz, P. (2011) Effect of acyl migration in Lipozyme TL IM-catalyzed interestification using a triacylglycerol model system. *European Journal of Lipid Science and Technology*. (DOI: 10.1002/ejlt.201100097)
- Talukder, M., Wu, J., Fen, N., Melissa, Y. (2010) Two-step lipase catalysis for production of biodiesel. *Biochemical Engineering Journal*, 49 (2), 207-212.
- Tamalampudi, S., Talukder, M., Hama, S., Numata, T., Kondo, A., Fukuda, H. (2008) Enzymatic production of biodiesel from *Jatropha* oil: A comparative study of immobilized whole-cell and commercial lipases as a biocatalyst. *Biochemical Engineering Journal*, 39, 185-189.
- Vieira, A., Barreto, M., Martins, L., Vasconcelos, V., Silva, G. (2009) Degomagem do óleo de moringa. *Encontro Nacional de Moringa*, Aracaju, Brasil.

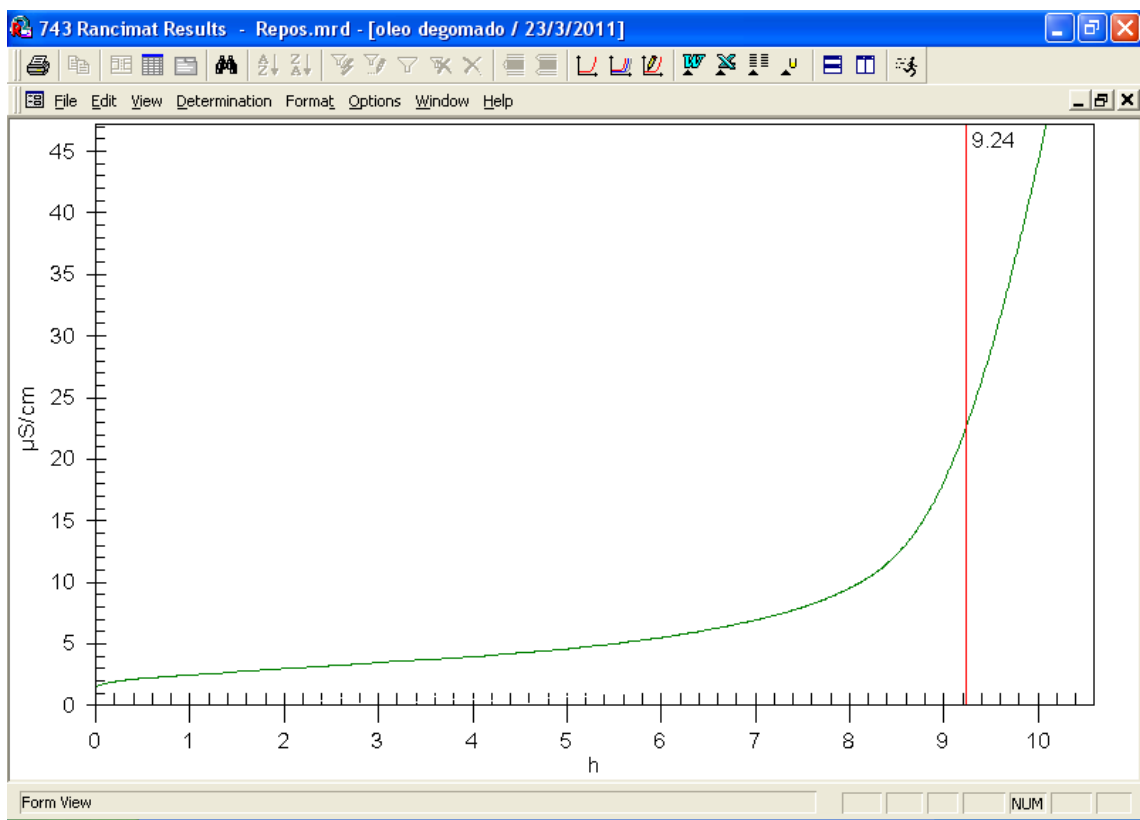
Zheng, S., Kates, M., Dubé, M., McLean, D. (2006) Acid-catalyzed production of biodiesel from waste frying oil. *Biomass and Bioenergy*, 30, 267-272.

Anexos

Anexo I - Cromatograma da determinação da composição em ácidos gordos do óleo das sementes de Santiago (lote de abril)



Anexo II - Resultados da estabilidade à oxidação do óleo degomado das sementes de Santiago (lote de agosto)



Anexo III - Resultados da determinação do teor de mono, di e triglicéridos, glicerol livre e glicerol total

9a-1.TXT - Bloco de notas								
Ficheiro Editar Formatar Ver Ajuda								
Title : Run File : c:\star\eder\9a.run Method File : C:\Star\Cristina\CALIB\Metodos\MDT_colantiga.mth Sample ID : 9a								
Injection Date: 04-05-2011 10:20 Calculation Date: 04-05-2011 10:52								
Operator : Detector Type: 0800 (1 volt) Workstation: Bus Address : 81 Instrument : FID Sample Rate : 50.00 Hz Channel : 1 = 1 Run Time : 32.000 min								
** Star Chromatography Workstation Version 5.52 ** 00395-7228-1CE-2301 **								
Run Mode : Analysis Peak Measurement: Peak Area Calculation Type: Internal Standard								
Peak No.	Peak Name	Result ()	Ret. Time (min)	Time offset (min)	Area (counts)	Sep. Code	width 1/2 (sec)	Status Codes
1		0.0000	0.245	0.000	14150299	BB	13.5	
2	glicerol	0.5632	1.736	-0.064	2948	VB	0.0	
3	PI1	0.7821	2.457	-0.043	8474	VB	0.0	
4		0.0000	2.906	0.000	208	VB	0.0	
5		0.0000	3.301	0.000	322	VB	0.0	
6		0.0000	3.627	0.000	77	BB	0.0	
7		0.0000	9.195	0.000	54	BB	2.6	
8		0.0000	9.342	0.000	1218	BB	3.6	
9	monopalmitin	0.1088	9.851	-0.029	801	VB	0.0	
10		0.0000	10.123	0.000	65	VB	0.0	
11		0.0000	10.409	0.000	1937	BB	4.2	
12	monooleina	no result	10.849	0.049	2908	BB	5.3	C*
13	monoestearin	0.1625	10.986	-0.014	333	VB	0.0	
14		0.0000	11.728	0.000	931	BB	0.0	
15		0.0000	12.042	0.000	519	VB	0.0	
16		0.0000	12.461	0.000	53	BB	0.0	
17		0.0000	12.722	0.000	2861	BB	5.5	
18		0.0000	13.361	0.000	369	BB	0.0	
19		0.0000	13.618	0.000	1103	BB	0.0	
20		0.0000	14.037	0.000	7716	BB	6.6	
21		0.0000	15.116	0.000	214	BB	6.9	
22	PI2	INT STD	16.010	0.010	33218	BB	7.0	S
23		0.0000	19.896	0.000	486	BV	8.3	
24		0.0000	20.195	0.000	49	TS	0.0	
25		0.0000	20.377	0.000	630	VB	8.5	
26		0.0000	21.094	0.000	262	BV	6.5	
27	dioleina	no result	21.279	-0.121	1190	VB	9.6	C*
28		0.0000	22.253	0.000	233	BB	5.8	
29		0.0000	24.149	0.000	332	BV	6.0	
30		0.0000	24.522	0.000	348	VV	5.0	
31		0.0000	24.715	0.000	381	VV	9.4	
32		0.0000	24.857	0.000	5721	VB	6.8	
33		0.0000	25.264	0.000	177	TS	0.0	

Anexo IV- Estimativa dos efeitos determinados pelo “Statistica 8”

STATISTICA - [Workbook1* - Effect Estimates; Var.:Ester; R-sqr=.79166; Adj.:54859 (BaseDados.sta)]

File Edit View Insert Format Statistics Data Mining Graphs Tools Data Workbook Window Help

Effect Estimates; Var.:Ester; R-sqr=.79166; Adj.:54859 (BaseDados.sta)
4 factors, 1 Blocks, 27 Runs; MS Residual=451,7666
DV: Ester

Factor	Effect	Std. Err.	t(12)	p	-95% Cnf. Limt.	+95% Cnf. Limt.	Coeff.	Std. Err. Coeff.	-95% Cnf. Limt.	+95% Cnf. Limt.
Mean/Interc.	61,1167	12,27147	4,96039	0,000320	34,3794	87,85369	61,1167	12,27147	34,3794	87,85369
(1)Temperatura(L)	-21,6375	8,67724	-2,49369	0,028245	-40,5436	-2,73142	-10,8188	4,33662	-20,2718	-1,36571
Temperatura(Q)	-3,2385	9,20360	-0,35188	0,731032	-23,2915	16,81438	-1,6193	4,60180	-11,6457	8,40719
(2)RM (L)	-25,1958	8,67724	-2,90367	0,013236	-44,1019	-6,28976	-12,5979	4,33662	-22,0510	-3,14488
RM (Q)	-0,3885	9,20360	-0,04222	0,967021	-20,4415	19,66438	-0,1943	4,60180	-10,2207	9,83219
(3)Lip (L)	2,6208	8,67724	0,30204	0,767796	-16,2852	21,52691	1,3104	4,33662	-8,1426	10,76345
Lip (Q)	-3,0885	9,20360	-0,33558	0,742962	-23,1415	16,96438	-1,5443	4,60180	-11,5707	8,48219
(4)H2O (L)	43,9125	8,67724	5,06065	0,000280	25,0064	62,81858	21,9563	4,33662	12,5032	31,40929
H2O (Q)	-8,9385	9,20360	-0,97120	0,350618	-28,9915	11,11438	-4,4693	4,60180	-14,4957	5,55719
1L by 2L	7,3563	10,62740	0,69220	0,501989	-15,7989	30,51137	3,6781	5,31370	-7,8994	15,25568
1L by 3L	-9,2187	10,62740	-0,86745	0,402709	-32,3739	13,93637	-4,6094	5,31370	-16,1869	6,96818
1L by 4L	5,6937	10,62740	0,53576	0,601913	-17,4614	28,84887	2,8469	5,31370	-8,7307	14,42443
2L by 3L	11,5188	10,62740	1,08367	0,299718	-11,6364	34,67387	5,7594	5,31370	-5,8182	17,33693
2L by 4L	-8,9437	10,62740	-0,84157	0,416482	-32,0989	14,21137	-4,4719	5,31370	-16,0494	7,10588
3L by 4L	9,4812	10,62740	0,89215	0,389651	-13,6739	32,63637	4,7406	5,31370	-6,8369	16,31818

Effect Estimates; Var.:Ester; R-sqr=.79166; Adj.:54859 (BaseD...

Analysis of a Central ... Ready BaseDados.st C1.V1 61,1166666666667 CAP NUM REC